



**Universidade Estadual de Maringá  
Centro de Ciências da Saúde  
Departamento de Farmácia e Farmacologia  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**

**“EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM IMIPRAMINA SOBRE A  
NEUROGÊNESE E SOBRE A MEMÓRIA DE RATOS SUBMETIDOS À  
ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL E TRANSITÓRIA”**

**Orientadora**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rúbia Maria Weffort de Oliveira (UEM/DFP)

**Co-orientador**

Prof Dr Humberto Milani (UEM/DFP)

**Pós-Graduanda – Mestrado**

Angélica Pupin Schiavon

**Maringá, 26 de março de 2009.**



**Universidade Estadual de Maringá  
Centro de Ciências da Saúde  
Departamento de Farmácia e Farmacologia  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**

**“EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM IMIPRAMINA SOBRE A  
NEUROGÊNESE E SOBRE A MEMÓRIA DE RATOS SUBMETIDOS À  
ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL E TRANSITÓRIA”**

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Maringá  
como requisito parcial para  
obtenção do título de mestre em  
Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rúbia Maria Weffort de Oliveira (UEM/DFP)

**Co-orientador**

Prof Dr Humberto Milani (UEM/DFP)

**Pós-Graduanda – Mestrado**

Angélica Pupin Schiavon

**Maringá, 26 de março de 2009.**

## **EPIGRAFE**

“A mente que se abre a uma nova  
idéia jamais voltará ao seu tamanho  
original.”

“O único lugar aonde o sucesso vem  
antes do trabalho é no dicionário.”

*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por iluminar meu caminho, colocando nele as pessoas certas e por me guiar com todas as ferramentas necessárias ao meu desenvolvimento acadêmico e científico.

A meus pais Márcia Cristina Pupin Schiavon e Levi Schiavon, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu os trilhasse sem medo, que se doaram inteiros e, muitas vezes, renunciaram aos seus próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus. A eles, pais por natureza, por opção e amor, não tenho palavras para agradecer todo o incentivo que tornaram possível a realização deste trabalho.

A minha irmã Adriane Pupin Schiavon, por sua constante amizade e companheirismo, auxiliando, sempre que podia, a realização deste sonho.

Ao meu namorado, amigo, companheiro, confidente e futuro marido Fabrício Fregadolli, que sempre me auxilia e me conforta com sua paciência e sabedoria que, com muito carinho e afeto, não mediu esforços para que eu concluísse mais esta etapa de minha vida.

Ao meu amigo Altair Ferri, que confiou em mim e abriu as portas aos primeiros contatos que tive com minha orientadora.

À professora Dra. Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira, pela orientação neste trabalho, por toda sua atenção e esforço, que tornaram possível a realização deste, por seus valiosos ensinamentos científicos e paciência ao compartilhar comigo um pouco do seu conhecimento. Obrigada por ser mais que uma orientadora, por ser uma amiga sempre que precisava de conselhos, por ter me adotado como *mãe* científica.

Ao professor Dr. Humberto Milani, pela co-orientação neste trabalho, por me auxiliar nesse início de carreira científica, pela sua compreensão em relação às minhas limitações (principalmente as limitações estatísticas), por nunca ter negado ajuda e por me aceitar como *sobrinha* científica e grande amiga.

À professora Dra. Célia Regina Ambiel e à professora Dra. Ciomar Aparecida Bersani Amado, que aceitaram, gentilmente, compor as bancas de qualificação e defesa desta dissertação.

Ao professor Dr. Roberto Barbosa Bazotte, pela paciência e compreensão, por nunca negar ajuda e pela amizade.

À pós-graduanda, amiga e companheira, desde a graduação, Cássia Valério Romanini, por sua inestimável colaboração na realização dos experimentos deste trabalho.

Aos técnicos Marcos Alberto Trombelli, Carlos Eduardo de Oliveira, Jaílson Araújo Dantas e Admir Arantes, pelo apoio técnico, por seus valiosos ensinamentos (inclusive culinários) e pela bela amizade.

Às auxiliares Solidalva Caruso Fernandes de Oliveira e Célia Regina Miranda, pelo apoio técnico e pela grande amizade.

Às secretárias Francisca Helena Mesquita de Carvalho e Érika Gobi dos Santos, pela dedicação e trabalho exemplar. Obrigada pelo carinho e pela constante amizade.

A todos os amigos pós-graduandos e graduandos do laboratório: Ailton, Juliana, Débora, Carla, Dalton, Simone, Marco Aurélio, Francine, Suelen, Rogério, Bruna, Camila, Emilene, Roberta, Lucas, Cláudia, Janaíne, Vinícius, Ricardo, Vívian, Emanuely, Lourielthon, Beatriz, Guilherme, pela amizade, apoio, compreensão e alegria, tornando, assim, agradável o ambiente de trabalho.

## Resumo

A isquemia cerebral global e transitória (ICGT), bem como o tratamento crônico com antidepressivos, estimulam a proliferação celular no giro denteado (GD) do hipocampo. Este estudo foi conduzido para analisar se a imipramina estimula a neurogênese induzida pela ICGT no giro denteado de ratos. O labirinto radial aversivo de 8 braços (LRA) foi utilizado para avaliar os efeitos da imipramina na memória de ratos submetidos à ICGT. Os ratos foram treinados durante 12 dias no LRA e submetidos à ICGT um dia após o último treino. Depois disso, foram administradas imipramina (20 mg/ Kg, *i.p.*) ou salina (1 ml/ Kg, *i.p.*) durante 14 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última injeção de imipramina ou salina, o 5-bromo-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (BrdU, 200 mg/ Kg, *i.p.*) foi administrado para marcar as células em divisão celular. A retenção da cognição foi avaliada, semanalmente, 16, 23 e 30 dias após a isquemia através da análise: i) do tempo de latência (tempo despendido pelo animal da arena central até o esconderijo), ii) dos erros de referência e iii) dos erros operacionais. A proliferação celular foi detectada 24 horas após a última administração de BrdU e a neurogênese foi avaliada 15 e 30 dias após a ICGT através da imunohistoquímica para *doublecortin* (DCX). A taxa de proliferação celular aumentou no 7º dia após a ICGT e retornou ao seu nível basal no 15º dia após a ICGT. Concomitantemente, houve aumento no número de neurônios jovens no GD 15 dias após a ICGT. O tratamento crônico de imipramina aumentou a expressão de células BrdU e DCX-positivas no GD de ratos isquêmicos, embora nenhum efeito sobre a memória retrógrada tenha sido observado no LRA. Em conclusão, o presente estudo mostra que a imipramina promove uma resposta neurogênica após a isquemia cerebral, mas não é acompanhada pela recuperação da função cognitiva. Estudos adicionais serão necessários para avaliar se o tratamento crônico por um período maior será capaz de melhorar tanto o desempenho de aquisição (aprendizagem) quanto o desempenho da retenção (memória) após a ICGT e sua relação com a neurogênese hipocampal.

**Palavras-chaves:** isquemia cerebral, imipramina, neurogênese, hipocampo, labirinto radial aversivo de oito braços, ratos.

## **Abstract**

Transient global cerebral ischemia (TGCI) as well as chronic antidepressant treatment stimulate the proliferation of precursor cells in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus. This study was aimed to determine whether imipramine further promotes the neurogenesis induced by TGCI in the rat dentate gyrus. The 8-arm aversive radial maze (AvRM) was used to address the effects of imipramine on ischemia-induced memory impairment. Rats were trained for 12 days in the AvRM and subjected to TGCI one day later. After that, the animals were administered imipramine (20 mg/kg, *i.p.*) or saline (1 ml/kg, *i.p.*) during 14 days. 5-bromo-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate (BrdU, 200 mg/kg, *i.p.*) was injected 24 h after the last imipramine or saline injection to label proliferating cells. Retention of cognition was assessed weekly on days 16, 23 and 30 post-ischemia and measured by i) the latency to find the goal box, ii) the number of reference memory errors, and c) the number of working memory errors. Cell proliferation was examined 24 h after the last BrdU and neurogenesis was evaluated 15 and 31 days after ischemia by DCX-immunohistochemistry. The rate of cell proliferation increases 7 days after TGCI but returns to basal levels after 15 days. Concomitantly, there was an increase in the number of new neurons in the DG 15 days after ischemia. Imipramine chronic treatment increased the expression of BrdU and DCX-labeled cells in DG of ischemic rats, although it produced no effect on ischemia-induced memory disruption in the AvRM task. In conclusion, the present study shows that imipramine can promote the neurogenic response to cerebral ischemia, an effect that was not accompanied by recovery of cognitive function. Additional studies are needed to evaluate whether imipramine treatment for longer time than that used presently would be able to improve both acquisition (learning) and retention (memory) performance after TGCI, and its relationship with neurogenesis.

**Keywords:** brain ischemia, imipramine, neurogenesis, hippocampus, aversive radial maze, rats.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**5-HT** – serotonina

**5-HT1a** – receptor serotoninérgico 1a

**ABC** – complexo avidina biotina

**ADs** – antidepressivos

**AVC** – acidente vascular cerebral

**BDNF** – fator neurotrófico derivado do cérebro

**BHE** – barreira hematoencefálica

**BO** – bulbo olfatório

**BrdU** – 5-bromo-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato

**BSA** – soro albumina bovino

**CA** – cornu Ammonis

**CCG** – camada celular granular

**DAB** – 3,3,9-hidrocloreto de diaminobenzidina

**DCX** – *doublecortin*

**EGF** – *epidermal growth factor*

**ERK** – quinase regulada por sinal extracelular

**F.D.** – fascia dentata

**FGF-2** – *fibroblast growth factor-2*

**Fi** – fímbria

**FMR** – fluxo migratório rostral

**FSC** – fluxo sanguíneo cerebral

**GD** – giro denteado

**GFAP** – proteína ácida fibrilar glial

**ICGT** – isquemia cerebral global e transitória

**IGF-1** – *insulin-like growth factor*

**LRA** – labirinto radial aversivo de oito braços

**NAd** – noradrenalina

**NeuN** – proteína nuclear específica de neurônios

**NMDA** – N-metil-D-aspartato

**Par** – parasubiculum

**PBS** – tampão fosfato salina

**PFA** – paraformaldeído

**Pres** – presubiculum

**Pros** – prosubiculum

**PSA-NCAM** – molécula de adesão neural polisialisada

**R.e.** – córtex entorrinal

**RT** – re-testes

**SNC** – sistema nervoso central

**sub** – subiculum

**ZSG** – zona subgranular

**ZSV** – zona subventricular



## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Anatomia das áreas cerebrais onde ocorre a neurogênese</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2. Fases da neurogênese no GD de animais adultos</b> .....	<b>8</b>
<b>1.3. Marcadores histológicos para neurogênese no hipocampo</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3.1. Imunoistoquímica para BrdU</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3.2. <i>Doublecortin</i> (DCX)</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4. Fatores que regulam a neurogênese no cérebro adulto</b> .....	<b>12</b>
<b>1.5. Isquemia cerebral e neurogênese</b> .....	<b>13</b>
<b>1.6. Antidepressivos e neurogênese</b> .....	<b>15</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1. Objetivo geral</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>17</b>
<b>3. Metodologia</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1. Animais</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2. Procedimento experimental</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2.1. Experimento 1</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2.2. Experimento 2</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2.3. Experimento 3</b> .....	<b>20</b>
<b>3.3. Isquemia cerebral global e transitória (ICGT)</b> .....	<b>21</b>
<b>3.4. Tratamento crônico com imipramina</b> .....	<b>23</b>
<b>3.5. Administração de BrdU</b> .....	<b>23</b>
<b>3.6. Preparação do tecido para histologia e imunohistoquímica</b> .....	<b>23</b>
<b>3.7. Análise quantitativa</b> .....	<b>25</b>
<b>3.8. O labirinto radial aversivo de 8 braços (LRA)</b> .....	<b>26</b>
<b>3.9. Análise estatística</b> .....	<b>28</b>
<b>3.9.1. Quantificação das células BrdU e DCX-positivas</b> .....	<b>28</b>

<b>3.9.2. Análise comportamental no LRA</b> .....	<b>28</b>
<b>4. Resultados</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1. Experimento 1</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2. Experimento 2</b> .....	<b>29</b>
<b>4.3. Experimento 3</b> .....	<b>30</b>
<b>4.3.1. Avaliação da sobrevivência e da neurogênese</b> .....	<b>30</b>
<b>4.3.2. Avaliação comportamental</b> .....	<b>30</b>
<b>5. Discussão</b> .....	<b>38</b>
<b>6. Referências</b> .....	<b>44</b>
<b>Apêndice</b> .....	<b>52</b>

## 1. Introdução

Neurogênese é a capacidade que o Sistema Nervoso Central (SNC) tem de formar novos neurônios em determinadas regiões cerebrais em resposta a diferentes estímulos (MALBERG *et al.*, 2000; NAKATOMI *et al.*, 2002). A descoberta de que a neurogênese ocorre no SNC durante toda a vida dos mamíferos, incluindo os seres humanos, mudou o pensamento da população sobre os cérebros dos adultos e as doenças a ele relacionadas (MALBERG, 2004). Os primeiros indícios de que novos neurônios surgiam no cérebro foram apresentados por Ezra Allen, em 1912. Ele mostrou a presença de figuras mitóticas nas paredes dos ventrículos laterais de cérebros de ratos albinos com até 120 dias de vida (ALLEN, 1912 apud BALU & LUCKI, 2009). Uma demonstração mais convincente de que esse fenômeno ocorria, foi publicada na década de 1960. Altman e Das demonstraram, através de autorradiografia, a presença de timidina tritiada, um nucleosídeo absorvido por células em fase de divisão celular, em cérebros de ratos adultos (ALTMAN & DAS, 1965 apud BALU & LUCKI, 2009). Entretanto, naquela época, esses resultados não foram aceitos pela comunidade científica porque não existiam evidências suficientes para provar que as células marcadas com timidina tritiada eram de fato neurônios, pois se pensava que as mesmas eram células em processo de reparo. Quinze anos depois, Kaplan e Hinds corroboraram os resultados de Altman e Das. Para provar a natureza neuronal das células marcadas com timidina tritiada, Kaplan e Hinds utilizaram técnicas de microscopia eletrônica (KAPLAN & HINDS, 1977 apud BALU & LUCKI, 2009). Como o fenótipo celular descrito era puramente baseado em caracteres morfológicos e marcadores imunohistoquímicos específicos para neurônios ainda não existiam, a maioria dos neurocientistas ainda não aceitou os resultados de Kaplan e Hinds.

No início dos anos 80, Fernando Nottebohm reacendeu o interesse do estudo da neurogênese em mamíferos adultos, através da demonstração de que um número substancial de novos neurônios surgia no encéfalo de canários adultos, particularmente em regiões associadas ao aprendizado do canto (GOLDMAN & NOTTEBOHM, 1983 apud BALU & LUCKI, 2009). Foi nessa época que o BrdU foi desenvolvido. Esta substância é um análogo da base pirimídica timidina e, portanto, pode ser considerada, de forma conceitual, semelhante à timidina tritiada, porque marca células em divisão

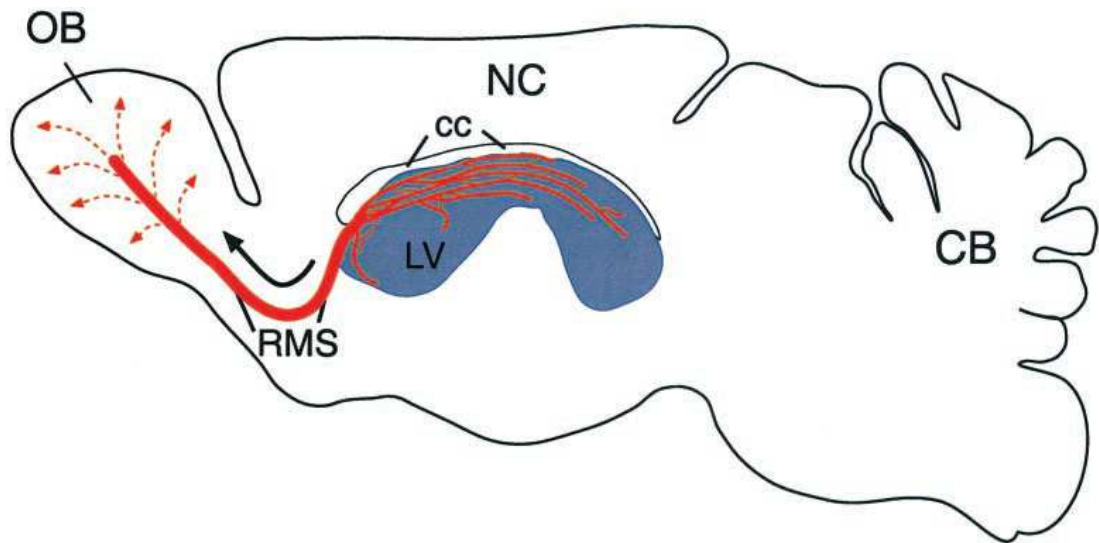
celular, ou seja, células em atividade mitótica (NOWAKOWSKI *et al.*, 1989). A vantagem é que o BrdU pode ser detectado usando imunohistoquímica e pode ser combinado com marcadores específicos para detectar neurônios ou células da glia, a fim de identificar o fenótipo celular.

A neurogênese foi demonstrada em diferentes espécies, incluindo aquelas filogeneticamente mais próximas ao homem, como musaranhos (GOULD *et al.*, 1997), primatas, sagüis e macacos do Novo Mundo (GOULD *et al.*, 1998), assim como em símios do gênero *Macaca*, conhecidos como macacos do Velho Mundo (GOULD *et al.*, 1999; KORNACK & RAKIC, 1999). Ainda mais importante, a neurogênese em adultos foi detectada em tecidos *post mortem* humanos (ERIKSSON *et al.*, 1998).

### **1.1. Anatomia das áreas cerebrais onde ocorre a neurogênese**

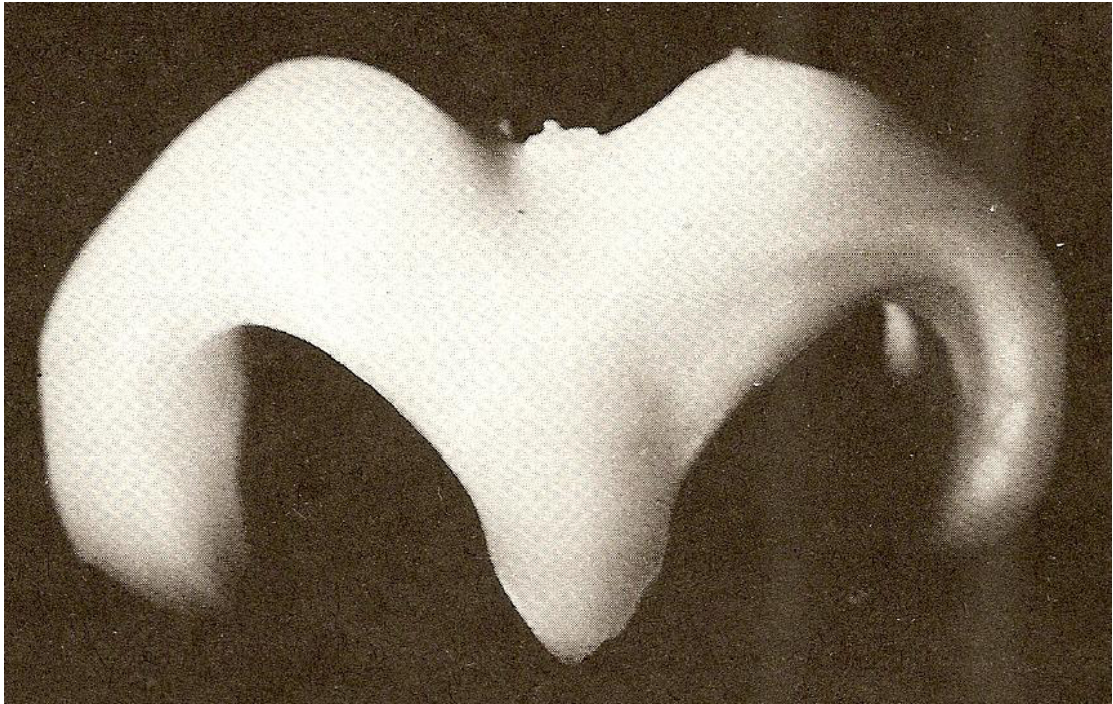
A neurogênese no SNC de mamíferos adultos é observada predominantemente em duas áreas cerebrais: a zona subventricular (ZSV) e a zona subgranular do hipocampo (SGZ).

A ZSV consiste em uma camada de células em divisão que se estende por todas as paredes da porção dorso-ventral do ventrículo lateral. Células progenitoras da ZSV rapidamente dão origem a neuroblastos através de progenitores proliferativos e, estes, são submetidos a uma cadeia de migração até o bulbo olfatório (BO) ao longo do fluxo migratório rostral (FMR) (Figura 1). No BO, as células recém-formadas diferenciam-se em inter-neurônios granulares ou periglomerulares que, subseqüentemente são funcionalmente integrados ao circuito do BO (GRAY, 1982).



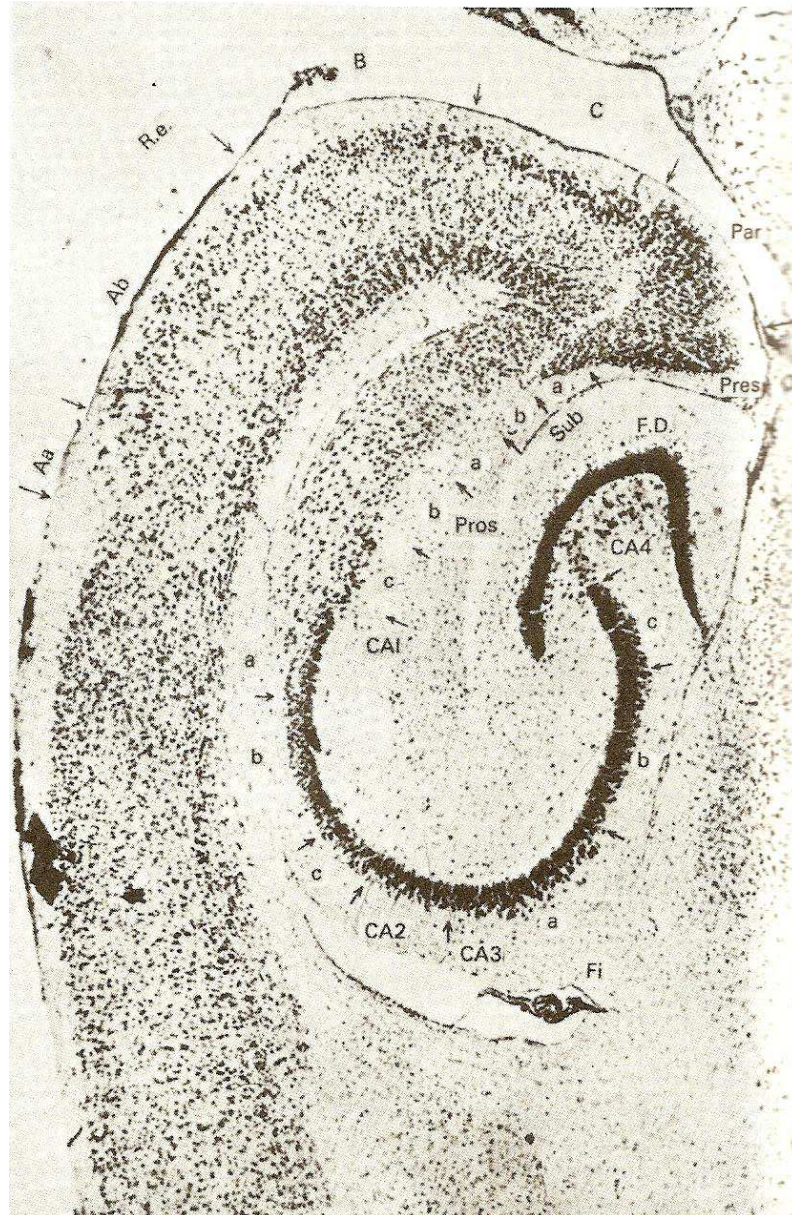
**Figura 1: Migração rostral em cérebros de roedores.** Progenitores da ZSV (em azul) tornam-se neuroblastos que formam uma cadeia de migração (em vermelho) através da parede ventricular (LV= ventrículo lateral) e do fluxo de migração rostral (RMS) em direção ao bulbo olfatório (OB). Uma vez no OB, ocorre a migração (setas) e os neurônios recém-formados integram-se ao circuito do OB. CB= cerebelo, NC= neocórtex, CC= corpo caloso. Fonte: ALVAREZ-BUYLLA & GARCIA-VERDUGO, 2002.

Uma outra área onde ocorre a neurogênese é a formação hipocampal. A Figura 2 mostra uma fotografia da formação hipocampal e da área septal excisadas do cérebro de um rato (GRAY, 1982). É fácil olhar para esse tecido e associá-lo à imagem de duas bananas unidas na frente. A região onde elas se unem é chamada de área septal; *in vivo*, o hipocampo se localiza próximo à frente do cérebro, na direção do focinho do animal. Sua estrutura interna é essencialmente a mesma em toda a sua extensão septo-temporal. É possível distinguir o hipocampo dorsal (a região mais próxima da área septal e a mais elevada no cérebro), a flexura ou arco do hipocampo (a região descendente mais caudal do hipocampo) e o hipocampo ventral (a região mais afastada da área septal e a mais profunda no cérebro) (GRAY, 1982).



**Figura 2:** Formação hipocampal e área septal dissecadas a partir do cérebro de um rato. Fonte: GRAY, 1982.

Uma secção transversal ao eixo septo-temporal do hipocampo revela duas linhas de células em forma de U interligadas (Figura 3). A formação em U superior é conhecida como o hipocampo propriamente dito ou “*cornu Ammonis*” e a menor formação em U é conhecida como giro denteado (GD) ou *fascia dentata*. Com base na morfologia, outras subdivisões são feitas dentro do hipocampo. Ao seguir a curvatura U mais afastada do GD, encontra-se uma camada dupla de células piramidais pequenas e médias que são definidas como *regio superior* ou CA1 (*cornu Ammonis* 1). A outra grande subdivisão consiste num semicírculo de células piramidais gigantes que seguem para dentro do GD, conhecida como *regio inferior*. Esta foi ainda subdividida por Lorente de Nó, no ano de 1934, em CA2, CA3 e CA4. A região CA4 refere-se às células piramidais mais dispersas sobre o hilus hipocampal, ou seja, a região delimitada pela formação em U do GD (GRAY, 1982).

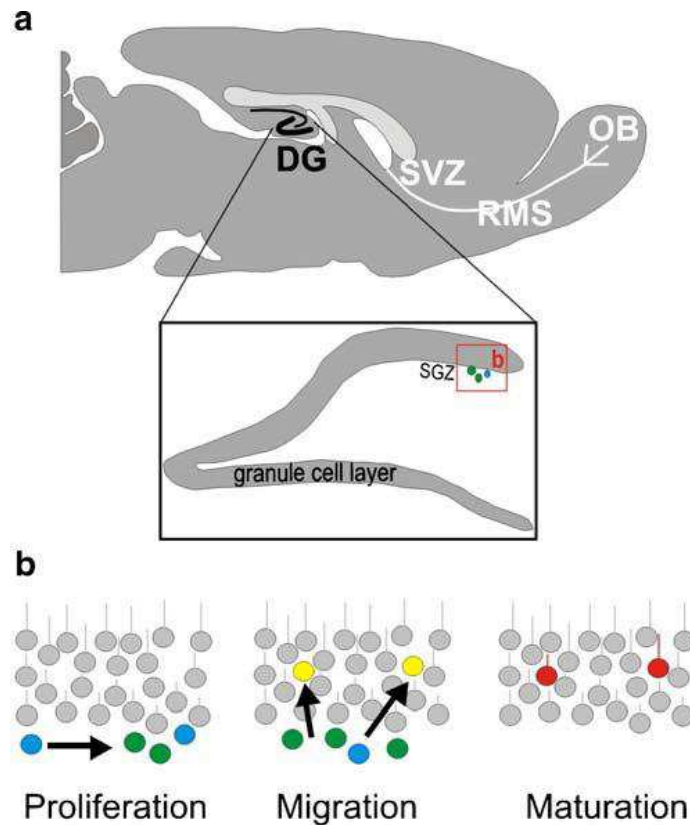


**Figura 3: Fotografia de uma secção transversal do lado direito do cérebro de camundongo.** A secção mostra o arco posterior do hipocampo e o córtex entorrinal (R.e.). Nota-se a transição gradual das seis camadas do córtex entorrinal, incluindo o parasubiculum (Par), o presubiculum (Pres), o subiculum (sub) e o prosubiculum (Pros) até as quatro camadas do hipocampo propriamente dito (CA1-CA4) e a *fascia dentata* (F.D.). Lorente de Nó ainda subdividiu algumas destas áreas (a, b, c). Fi é a fímbria marcada com o corante de Nissl. Fonte: GRAY, 1982.

Vários tipos celulares podem ser observados na formação hipocampal. Células piramidais podem ser observadas no CA1, CA2 e CA3, enquanto células granulares aparecem no GD. Esses diferentes tipos de células, suas aferências e eferências, estão organizados de modo a formar camadas celulares que podem ser facilmente reconhecidas em cortes histológicos (GRAY, 1982).

No hipocampo de ratos adultos, a neurogênese ocorre na ZSG (Figura 4) do GD. Células imaturas migram para a camada celular granular (CCG) e diferenciam-se em neurônios granulares. Estes novos neurônios expandem seus axônios até a camada de células piramidais da região CA3 do hipocampo, tornando-se, portanto, funcionalmente integrados aos circuitos hipocampais. Evidências indicam que os neurônios recém formados exibem plasticidade sináptica facilitada, o que poderia auxiliar na formação do humor e da memória (VON BOHLEN, 2007).





**Figura 4: Neurogênese em roedores adultos.** **a)** A neurogênese em cérebros de adultos é observada, principalmente, na zona subventricular (SVZ) e no giro denteado (DG) do hipocampo. As novas células geradas na SVZ migram através do fluxo migratório rostral (RMS) até alcançar seu destino final no bulbo olfatório (OB), enquanto que, no DG, as células progenitoras estão localizadas na zona subgranular (SGZ) do DG. Essas células proliferam-se e migram para a camada celular granular do DG. **b)** Representação da neurogênese em roedores adultos no DG. Na SVZ, as células progenitoras (azul), proliferam-se e se diferenciam dando origem a novas células (verde). Células recém-formadas podem migrar para a camada granular do DG (amarelo). As células diferenciadas tornam-se pós-mitóticas, estendem seus axônios em direção à região CA3 e enviam seus dendritos através da camada molecular (vermelho), que, depois, tornam-se funcionalmente integrados à rede hipocampal. Fonte: VON BOHLEN, 2007.

## 1.2. Fases da neurogênese no GD de animais adultos

A neurogênese hipocampal em adultos pode ser dividida em 5 fases (Figura 5) (VON BOHLEN, 2007):

Fase 1 (fase de proliferação): Durante este primeiro estágio, a nova geração de células expressa a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e a nestina (FUKUDA *et al.*, 2003; FILIPPOV *et al.*, 2003). Sugere-se que essas células sejam células-tronco e, portanto, importantes células progenitoras que representam, na ZSG do GD, um subconjunto de astrócitos que dará origem a novas células granulares (SERI *et al.*, 2001). Esses precursores apresentam muitas características semelhantes às células gliais embrionárias (LEVITT & RAKIC, 1980; ECKENHOFF & RAKIC, 1984; CAMERON *et al.*, 1993), que atuam como progenitoras de neurônios durante o desenvolvimento embrionário (HARTFUSS *et al.*, 2001).

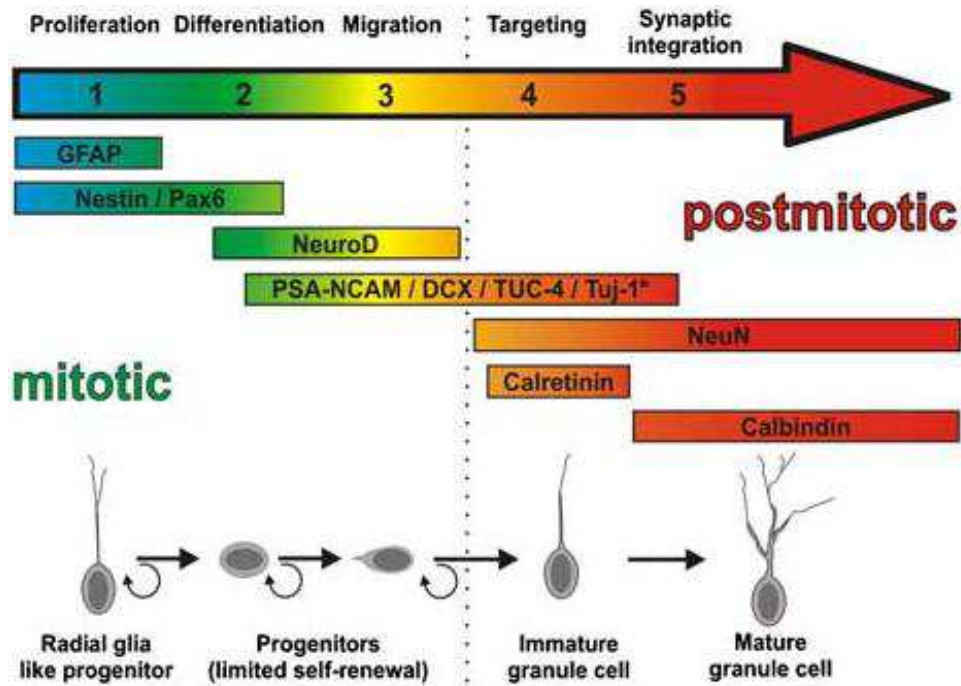
Fase 2 (fase de diferenciação): Representa a fase em que as células transitórias amplificadas se diferenciam em neurônios maduros na ZSG. As células do início da fase 2 são positivas para a nestina, mas negativas para GFAP. Por outro lado, apresentam alto poder de proliferação (KRONENBERG *et al.*, 2003). Durante essa fase, as células também formam uma linhagem neuronal. Mais tarde, as células da fase 2 param de expressar nestina e começam a expressar DCX e a forma embrionária da molécula de adesão neural polissialisada (PSA-NCAM; KRONENBERG *et al.*, 2003; FUKUDA *et al.*, 2003).

Fase 3 (fase de migração): Os neurônios imaturos expressam tanto PSA-NCAM quanto DCX. Eles migram uma curta distância até a camada de células granulares do GD (VON BOHLEN, 2007).

Fase 4 (fase de segmentação de axônios e dendritos): Os neurônios imaturos enviam seus dendritos em direção à camada molecular do GD e estendem suas projeções axonais em direção à camada CA3 do hipocampo (camada de células piramidais). Ainda nessa fase, a nova geração de neurônios torna-se pós-mitótica. Os neurônios imaturos ainda expressam DCX e PSA-NCAM (KEMPERMANN *et al.*, 2004; MING & SONG, 2005). Já os neurônios pós-mitóticos mais recentes, pelo menos em camundongos, expressam, transitoriamente, a proteína calretinina (BRANDT *et al.*,

2003; LLORENS-MARTIN *et al.*, 2006) e o marcador neuronal NeuN (proteína nuclear específica de neurônios; BRANDT *et al.*, 2003).

Fase 5 (integração sináptica): Nesta fase, os novos neurônios granulares formados estabelecem seus contatos sinápticos através da entrada pelo córtex entorrinal e da saída para a região do CA3 e do *hilus*. Aproximadamente 2-3 semanas depois que a nova geração de células torna-se pós-mitótica, a calretinina parece ser trocada por calbidina em células granulares maduras (BRANDT *et al.*, 2003; KEMPERMANN *et al.*, 2004). A calbidina está presente em todas as células granulares maduras (RAMI *et al.*, 1987; BAIMBRIDGE, 1992) e a nova geração de células formadas que expressam calbidina tornam-se funcionalmente integradas no hipocampo (VAN PRAAG *et al.*, 2002). Esses neurônios também expressam o marcador neuronal pós-mitótico NeuN (KUHN *et al.*, 1996).



**Figura 5: Fases da neurogênese no GD de adultos e a expressão de marcadores específicos.** A geração de novos neurônios na camada granular do GD pode ser dividida em cinco fases. Uma célula-tronco que pode estar localizada fora da ZSV começa a se proliferar (azul). Os precursores formados começam a se proliferar (fase 1), dando origem a células de transição (verde), que se diferenciam em neurônios imaturos (fase 2). Durante a fase 3 (amarelo), os neurônios imaturos migram através de uma curta distância até atingirem a camada granular do GD. Durante a fase 4 (laranja), os neurônios imaturos e os pós-mitóticos estendem seus axônios em direção à camada piramidal da região CA3 do hipocampo e enviam seus dendritos em direção à camada molecular do GD. Na fase 5 (vermelho), as novas células granulares são sinapticamente integradas à rede de formação do hipocampo, recebendo insumos entorrinais do córtex e enviando saídas para a região CA3 e para o hilus. Em várias fases de desenvolvimento da neurogênese no GD de adultos, diferentes moléculas específicas são expressas pelas células recém-formadas, que não só podem servir como marcadores gerais de neurogênese, mas também ajudar no acompanhamento das diferentes fases da neurogênese. Fonte: VON BOHLEN, 2007.

### **1.3. Marcadores histológicos para neurogênese no hipocampo**

#### **1.3.1. Imunohistoquímica para BrdU**

Um avanço na identificação de células na fase S da divisão mitótica foi obtido através do desenvolvimento da imunohistoquímica para BrdU (MILLER & NOWAKOWSKI *et al.*, 1988), já que essa técnica permite que seja estimado o número de células em divisão, mesmo em secções muito finas (SCHARFMAN *et al.*, 2005).

O BrdU é, geralmente injetado intraperitonealmente em animais experimentais. O número de células marcadas dentro do cérebro varia conforme se altera o modo de administração, duração, concentração do BrdU, tempo de sobrevivência após a administração da injeção de BrdU (CAMERON & MCKAY, 2001; DAYER *et al.*, 2003). Por exemplo, altas concentrações de BrdU (aproximadamente 300 mg/Kg) parecem ser necessárias para marcar todas as células em fase S de mitose no GD de adultos, porque o BrdU precisa atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) para poder agir (CAMERON & MCKAY, 2001). Após cruzar a BHE, o BrdU é incorporado pelo DNA das células durante a fase S da mitose. Assim, poucas horas após administração sistêmica de BrdU é possível visualizar a proliferação celular. Além disso, se a detecção do BrdU é realizada dias ou semanas mais tarde, é possível visualizar a sobrevivência e a diferenciação das células BrdU-positivas que se tornam neurônios maduros ou células da glia (KEE *et al.*, 2002).

Uma célula imunorreativa para BrdU pode ser uma progenitora de novos neurônios, mas pode também dar origem à linhagem glial. A marcação com BrdU, sem o uso de marcadores adicionais, é um indicador geral para gênese de células no cérebro; um aumento no número de células marcadas com BrdU não indica, por si só, a geração de novos neurônios. Para determinar se a marcação para BrdU está relacionada à neurogênese, é necessário combiná-lo a um marcador imunohistoquímico específico para corar os novos neurônios formados nas fases de desenvolvimento da neurogênese (VON BOHLEN, 2007).

#### **1.3.2. Doublecortin (DCX)**

DCX é uma proteína que promove a polimerização de microtúbulos; está presente em neuroblastos migrantes e neurônios jovens, e pode servir como um marcador de neurogênese no hipocampo de animais adultos (GLEESON *et al.*, 1999).

A expressão de DCX é tida como específica para neurônios recém-gerados, uma vez que praticamente todas as células DCX-positivas expressam antígenos neuronais recentes, mas não apresentam antígenos específicos para glia, células indiferenciadas ou células em apoptose. A expressão de DCX pode ser detectada através das diferentes fases da neurogênese em adultos, desde os processos finais da fase 2 até os processos iniciais da fase 5 (Figura 5), na qual ocorre a interação dos novos neurônios à rede sináptica (RAO & SHETTY, 2004).

#### **1.4. Fatores que regulam a neurogênese no cérebro adulto**

Atualmente, sabe-se que um grande número de fatores regula o processo de proliferação celular no SNC de ratos adultos, tais como a idade, a espécie, o sexo, alguns hormônios, o ambiente, a prática de exercícios físicos e a aprendizagem (MALBERG *et al.*, 2000). Alguns estudos revelam que existem fatores que levam ao decréscimo da proliferação celular e da neurogênese, tais como o estresse agudo ou o estresse crônico físico ou psicossocial. Por exemplo, uma simples exposição de ratos ao cheiro do predador já foi suficiente para causar um decréscimo na proliferação celular, comprovada por marcadores como a timidina tritiada e o BrdU (TANAPAT *et al.*, 1998; TANAPAT *et al.*, 2001). Por outro lado, outros fatores podem incrementar a neurogênese no SNC adulto. Exemplos disso são a isquemia global e a focal, que induzem o aumento do número de neurônios novos na ZSV dos ventrículos laterais cerebrais e na ZSG do giro denteado do hipocampo (LIU *et al.*, 1998; YAGITA *et al.*, 2001). Além disso, o tratamento com antidepressivos (ADs) também resulta em um aumento na proliferação celular e na neurogênese, conforme será visto posteriormente. A fluoxetina (inibidor específico de recaptção de serotonina (5-HT)), a tranilcipromina (inibidor da monoaminaoxidase – IMAO), a reboxetina (inibidor específico de recaptção da noradrenalina (NAd)) e a imipramina (inibidor de recaptção da 5-HT e da NAd) são exemplos de antidepressivos que produzem esse efeito.

### **1.5. Isquemia cerebral e neurogênese**

A redução aguda ou crônica do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) representa uma causa importante de lesão neuronal, com conseqüentes disfunções neurológicas e comportamentais, parciais ou permanentes. A lesão cerebral isquêmica ocorre agudamente mediante dois mecanismos principais: a) oclusão de uma artéria cerebral (*stroke* ou acidente vascular cerebral - AVC) ou b) parada cardíaca ou choque hipotensivo grave (ZOLA-MORGAN *et al.*, 1986; PETITO *et al.*, 1987). Disfunções neuropsicológicas, incluindo déficit de aprendizagem e memória, são as principais conseqüências da ICGT. Em algumas circunstâncias, os pacientes são severamente afetados, apresentando uma grande variedade de déficit de memória e disfunção cognitiva que sua reintegração psicossocial e vocacional torna-se prejudicada (FERNANDES *et al.*, 2008). Seqüelas estruturais e neuropsicológicas também podem ocorrer durante procedimentos terapêuticos, tais como cirurgias de peito aberto ou mesmo durante procedimentos diagnósticos como o cateterismo (CUMMINGS *et al.*, 1984; SUDO *et al.*, 2001). No tocante ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas para tais circunstâncias, duas abordagens parecem promissoras: a abordagem neuroprotetora, que visa a redução ou bloqueio da morte neuronal induzida pela isquemia, através, por exemplo, de drogas ditas neuroprotetoras ou agentes físicos como a hipotermia, e a abordagem neuroregenerativa, a qual explora a possibilidade de reorganização neuronal (plasticidade) a partir do próprio tecido nervoso remanescente ou, então, através do implante de neurônios diferenciados ou células-tronco.

No rato, tanto a ICGT (LIU *et al.*, 1998; TAKAGI *et al.*, 1999; KEE *et al.*, 2001; YAGITA *et al.*, 2001) quanto a isquemia focal (ARVIDSSON *et al.*, 2001; KOMITOVA *et al.*, 2002), induzem um aumento da proliferação celular na ZSG do hipocampo. Se tais neurônios podem reparar a lesão ocorrida, por exemplo, na região CA1 após ICGT, não está devidamente esclarecido. Tem sido observado, entretanto, que a infusão intraventricular de fatores de crescimento, como o EGF (*epidermal growth factor*) ou FGF-2 (*fibroblast growth factor-2*), após isquemia, resulta em um intenso processo de regeneração dos neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo de ratos (NAKATOMI *et al.*, 2002). Esses neurônios recebem *input* sináptico e se projetam para

o subículo, exibindo recuperação de respostas sinápticas, como a potenciação a longo prazo e uma melhora no desempenho no labirinto aquático. Ainda, a possibilidade de células progenitoras se tornarem neurônios funcionais aumenta, no sentido que as mesmas expressam, por exemplo, atividades de fosforilação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) em resposta à administração intracerebroventricular de N-metil-D-aspartato (NMDA, KAWAI *et al.*, 2004).

Os mecanismos moleculares que regulam a neurogênese induzida pela isquemia ainda não são bem compreendidos. Hipoteticamente, fatores de transcrição, moléculas sinalizadoras e fatores de crescimento poderiam participar deste fenômeno (KOKAIA & LINDAVALL, 2003). Jin e colaboradores (2003) mostraram que a hipóxia em cultura de células corticais estimula a neurogênese através da liberação de fatores de crescimento, tais como FGF-2. Além disso, o tratamento agudo com o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) estimula a neurogênese e a maturação de neurônios piramidais no CA1 do hipocampo após a isquemia cerebral, promovendo recuperação neuronal e comportamental (NAKATOMI *et al.*, 2002). Finalmente, a infusão de outros fatores, como a citocina eritropoetina, tem mostrado uma neurogênese modular no hipocampo (SHINGO *et al.*, 2001).

Não obstante, do ponto de vista clínico, o uso de fatores de crescimento se esbarra em limitações farmacocinéticas, ou seja, tais substâncias não ultrapassam a BHE após a aplicação sistêmica. Entretanto, a administração de substâncias que agem estimulando a atividade destes fatores, como o BDNF endógeno, a exemplo dos medicamentos ADs, poderia representar uma estratégia terapêutica racional para promover a recuperação neuronal e funcional após o insulto isquêmico.

### **1.6. Antidepressivos e neurogênese**

Os ADs são as drogas mais freqüentemente prescritas para o tratamento da depressão, ainda que os mecanismos celulares e moleculares pelos quais estes agentes exercem seus efeitos terapêuticos ainda não sejam bem compreendidos. A maioria dos ADs aumenta os níveis de monoaminas, tais como 5-HT e NAd no SNC, o



que sugere que um desequilíbrio neste sistema seja a base da patogênese da depressão. Embora os ADs promovam um rápido aumento no nível de monoaminas na fenda sináptica, o aparecimento dos efeitos terapêuticos ocorre usualmente dentro de 2 a 4 semanas do início do tratamento (WONG & LICINIO, 2001). Essa latência para a obtenção do efeito terapêutico sugere que alterações estruturais e neuroquímicas de desenvolvimento mais lento possam ocorrer em áreas límbicas que recebem projeções monoaminérgicas, como por exemplo, no hipocampo (SANTARELLI *et al.*, 2003).

O hipocampo é uma estrutura cerebral que tem despertado grande interesse em relação aos efeitos terapêuticos dos ADs, bem como a patogênese dos distúrbios afetivos, incluindo a depressão. Estudos de neuro-imagem e *post mortem* mostram atrofia ou perda neuronal no hipocampo e córtex frontal de pacientes com depressão (SHELIN *et al.*, 1996; SHAH *et al.*, 1998). Também, situações de estresse crônico, fator conhecidamente desencadeador de depressão em humanos (POST, 1992), causa morte celular e decréscimo de neurotrofinas no hipocampo (SAPOLSKY, 1992; DUMAN *et al.*, 1997; MCEWEN, 1999). Por outro lado, estudos recentes mostram que o hipocampo está entre as poucas regiões cerebrais onde a neurogênese pode ocorrer durante toda a vida (ERIKSSON *et al.*, 1998).

O tratamento crônico com medicamentos ADs de várias classes, incluindo a fluoxetina e imipramina, mas não outras drogas psicotrópicas como o antipsicótico haloperidol, aumentam o número de células progenitoras no hipocampo, as quais se diferenciam em neurônios maduros (MALBERG *et al.*, 2000; SANTARELLI *et al.*, 2003). É interessante notar que o pico da neurogênese se dá no 14º dia de tratamento com ADs e se mantém num platô até o 28º dia, o que coincide com o aparecimento do efeito terapêutico na clínica (SANTARELLI *et al.*, 2003). Neste sentido, Santarelli e colaboradores (2003) sugerem que os efeitos comportamentais da administração crônica de ADs podem ser mediados pela estimulação da neurogênese no hipocampo. Com base em métodos radiológicos e genéticos, esse grupo demonstrou que a aplicação de radiação X não impede só a neurogênese hipocampal, mas também o aparecimento dos efeitos comportamentais relacionados aos ADs. Além disso, camundongos que não expressam o receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1a</sub> (*knockout*), são insensíveis aos efeitos neurogênicos e comportamentais da fluoxetina. Esses dados

mostram que os efeitos neurogênicos dos ADs são mediados por mecanismos serotoninérgicos específicos, os quais podem estimular a síntese de fatores neurotróficos como o BDNF e o IGF-1 (*insulin-like growth factor*).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Investigar se o tratamento crônico com imipramina incrementa a resposta neurogênica hipocampal e promove a recuperação funcional após ICGT.

### **2.2. Objetivos específicos**

Avaliar se o tratamento crônico com a imipramina altera a neurogênese no hipocampo de ratos submetidos à lesão isquêmica do cérebro através da imunohistoquímica para BrdU e DCX.

Investigar os efeitos comportamentais da administração crônica de imipramina sobre o desempenho de animais submetidos à ICGT no LRA.

### **3. Metodologia**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, com idade de 3 a 4 meses (280-320 gramas). Os animais permaneceram em condições padrões de alojamento, com ciclo de luz claro/escuro (12 h), temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e suprimento de água e ração à vontade durante o desenvolvimento de todo o experimento.

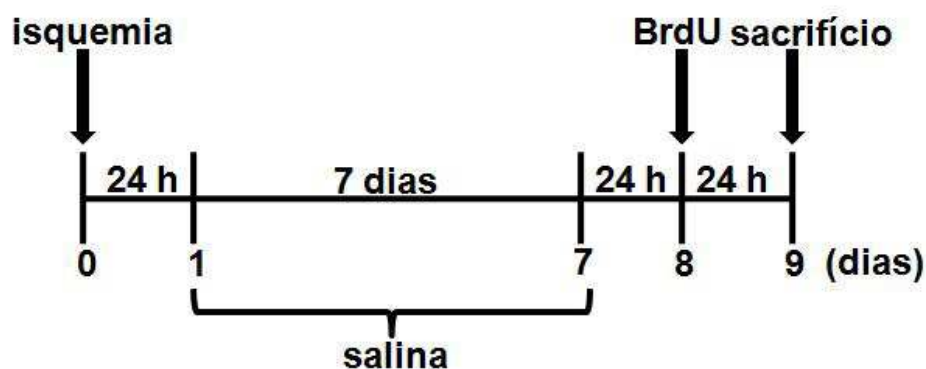
Os procedimentos experimentais seguiram os “Princípios Básicos para a Utilização Animal”, conforme aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (Parecer CEEA 066/2005).

### 3.2. Procedimento experimental

#### 3.2.1. Experimento 1

O experimento 1 foi realizado para a padronização da cirurgia da ICGT e para a confirmação de que este procedimento estimula a neurogênese no hipocampo de ratos (KAWAI *et al.*, 2004).

No primeiro dia, os animais (n=5-7) foram submetidos à ICGT (ver item 3.3) por um período de 15 minutos. Salina estéril foi administrada intra-peritoneamente (*i.p.*) por uma semana, iniciando-se a administração um dia após a ICGT. BrdU foi administrado 24 horas após a última administração de salina. Os animais foram, então, sacrificados e tiveram seus cérebros retirados para posterior análise imunohistoquímica, 24 horas depois de finalizada a administração de BrdU (Esquema 1).



**Esquema 1:** Passos realizados na padronização da cirurgia e obtenção do tecido nervoso para a detecção imunohistoquímica do BrdU.

#### 3.2.2. Experimento 2

O experimento 2 foi realizado para a análise da proliferação celular e neurogênese após tratamento crônico com imipramina.

Os animais (n=5-7) foram submetidos à ICGT por 15 minutos e 24 horas depois, receberam salina (0,1 mL/Kg) ou imipramina (20 mg/Kg) durante 14 dias. BrdU foi

administrado 24 horas após o último dia de tratamento com salina ou imipramina. Da mesma forma que no experimento 1, os animais foram sacrificados 24 horas depois de finalizada a administração de BrdU e tiveram seus cérebros retirados para posterior análise imunohistoquímica para detecção de BrdU e DCX (Esquema 2).



**Esquema 2:** Passos realizados para a análise da proliferação celular e neurogênese em animais submetidos à ICGT tratados ou não com imipramina.

### 3.2.3. Experimento 3

Este experimento foi realizado em duas etapas, com o objetivo de: *i*) avaliar a sobrevivência e a neurogênese após tratamento crônico com imipramina e, *ii*) verificar o comportamento dos animais no LRA.

Após 13 dias consecutivos de treino no LRA, os animais foram submetidos à ICGT e, subseqüentemente, ao tratamento crônico com salina ou imipramina durante 14 dias consecutivos (Esquema 3). BrdU foi administrado 24 horas após os tratamentos.

Os animais (n=7-10) foram submetidos a três testes de retenção ou re-testes (RT) no LRA, com intervalos de 7 dias entre cada RT. Vinte e quatro horas após o último RT, os animais foram sacrificados e tiveram seus cérebros retirados para posterior análise imunohistoquímica para detecção de BrdU e DCX (Esquema 3).



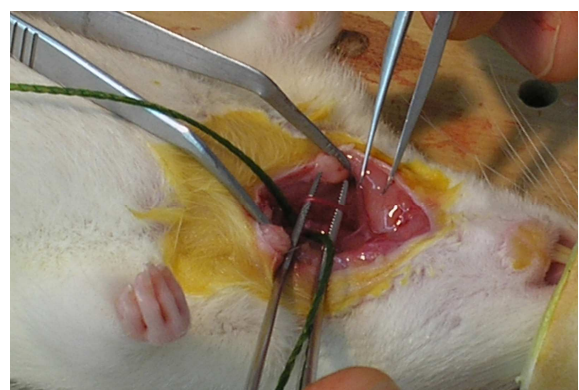
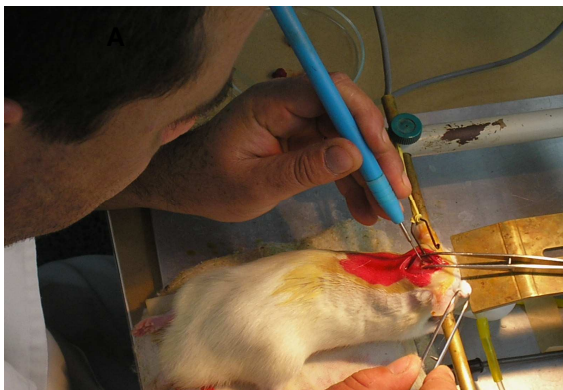
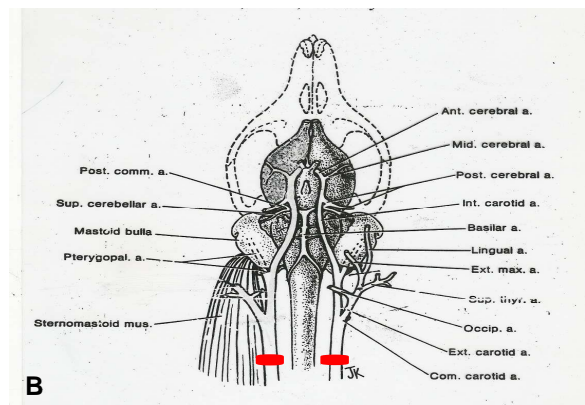
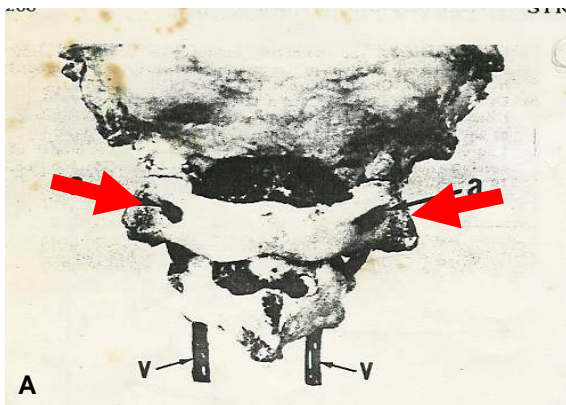
**Esquema 3:** Passos realizados para a análise comportamental dos animais no LRA e obtenção do tecido nervoso para a detecção imunohistoquímica.

### 3.3. Isquemia cerebral global e transitória (ICGT)

A ICGT foi realizada por um período de 15 minutos, utilizando-se o método de oclusão dos 4-vasos inicialmente proposto por Pulsinelli & Brierley (1979) e modificado por Milani e colaboradores (1998). Os animais foram anestesiados por fluxo contínuo de inalação de halotano (Tanohalo<sup>®</sup>, Cristália, Itapira-SP, Brasil) e gás oxigênio. Em seguida, as artérias vertebrais foram permanentemente ocluídas através da eletrocoagulação com um bisturi eletrônico (Medical Cirúrgica Ltda., Medcir<sup>®</sup> BM-560, São Paulo – SP, Brasil) nos foramens alares localizados na primeira vértebra cervical. Concomitantemente, os animais, ainda sob o efeito do anestésico halotano, tiveram os ramos comuns das artérias carótidas expostos e isolados dos tecidos adjacentes através de um fio de seda, cujas extremidades ficaram exteriorizadas. A incisão foi fechada com linha de algodão e os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) para se recuperarem da anestesia (Figura 7).

Quatro horas depois da cirurgia, os animais foram submetidos à oclusão das artérias carótidas por 15 minutos mediante tração dos fios de seda. Durante a oclusão, os sinais de perda do reflexo de endireitamento, midríase, estiramento tônico das patas, temperatura retal mantida entre 37-38°C e ausência de respostas à estimulação tátil foram considerados indicativos de uma isquemia efetiva. Animais que recobriram o reflexo de endireitamento ou sofreram convulsão foram eliminados.

Para os animais controle, denominados *sham*, os procedimentos anestésicos utilizados foram os mesmos com a diferença de que os animais não tiveram nenhuma das artérias ocluídas e, portanto, não sofreram injúria isquêmica.



C

D

**Figura 7: Esquemas representativos e fotografias da cirurgia de indução à ICGT.** As setas (em A) indicam os forâmens alares localizados na primeira vértebra cervical por onde percorrem as artérias vertebrais que são eletrocoaguladas, como mostra a fotografia C. Os pequenos traços vermelhos (em B) indicam os ramos comuns das artérias carótidas que são expostos e isolados dos tecidos adjacentes através de um fio de seda, cujas extremidades ficam exteriorizadas, como mostra a fotografia D.

### 3.4. Tratamento crônico com imipramina

Salina (0,1 mL/Kg) ou imipramina (20 mg/ Kg; Sigma-Aldrich, St. Louis-MO, U.S.A.) foram administrados via *i.p.*, 1 vez ao dia, durante 14 dias consecutivos (SAIRANEN *et. al.*, 2005).

De acordo com o tratamento, foram definidos 4 grupos experimentais:

**Grupo 1:** Falsa isquemia (*sham*) + salina = controle intacto.

**Grupo 2:** Falsa isquemia (*sham*) + imipramina (20 mg/Kg).

**Grupo 3:** Isquemia + salina = controle isquêmico.

**Grupo 4:** Isquemia + imipramina (20 mg/Kg).

### 3.5. Administração de BrdU

O análogo da base pirimídica timidina e marcador de proliferação celular, BrdU (Sigma-Aldrich, St. Louis-MO, U.S.A), foi dissolvido em salina estéril (0,9%) acrescido de 0,1316 N de solução de NaOH 10N. A administração foi realizada sempre 24 horas



após o último dia de tratamento, na dose de 50 mg/ Kg, *i.p.*, 4 vezes ao dia, com intervalos de 2 horas entre cada aplicação.

### **3.6. Preparação do tecido para histologia e imunohistoquímica**

Vinte e quatro horas (experimentos 1 e 2) ou 15 dias (experimento 3) após a última injeção de BrdU, os animais foram anestesiados com *overdose* de tiopental (Thiopentax<sup>®</sup>, Cristália, Itapira-SP, Brasil) para posterior perfusão transcardíaca com 88 mL de salina (0,9%) seguida de 132 mL de solução de paraformaldeído (PFA) 4% (pH=7,4) em tampão fosfato (PB) 0,2 M. Os cérebros foram removidos, pós-fixados em solução de PFA 4% em PB 0,2 M, por 2 horas. Durante 72 h, os cérebros foram mantidos em solução de sacarose 30% em tampão fosfato salina (PBS) 0,1M a 4°C para crioproteção. Após congelamento adequado, mergulhando os cérebros em isopentano sob refrigeração de nitrogênio líquido, estes foram seccionados num micrótomo criostato (Leica, 1850). As secções (40 µm) foram coletadas em placa de 24 poços.

Para a imunohistoquímica e detecção do BrdU, o DNA das secções foi desnaturado com solução de tripsina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Steinheim, Alemanha) 0,005% em água destilada por 5 minutos a 37°C, solução de glicina (Invitrogen<sup>®</sup>, Carlsbad, EUA) 0,1 M em PBS 0,1 M por 5 minutos à temperatura ambiente, HCl (Synth<sup>®</sup>, Diadema-SP, Brasil) 1 N por 75 min a 40°C e solução de ácido bórico (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha) 0,1 M em água destilada à temperatura ambiente por 10 minutos. Após sucessivas lavagens em PBS 0,1 M, as secções foram incubadas com 2% de soro albumina bovino (BSA; Santa Cruz Biotechnology) em PBS 0,1 M durante 60 min para o bloqueio de reações inespecíficas. As secções foram, então, incubadas com anticorpo *mouse* anti-BrdU (1:100, Santa Cruz Biotechnology) em solução contendo 0,3% Triton-X 100 (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Steinheim, Alemanha) em PBS 0,1 M e foram mantidas sob agitação constante durante 48 horas. Após este período, as secções foram lavadas com PBS 0,1 M e, então, incubadas com o anticorpo secundário *goat anti-mouse* biotilado (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) por 2 horas. Posteriormente, foram incubadas com o complexo avidina-biotina (ABC; Kit, Vector Laboratories) por mais 2 horas. A revelação foi realizada usando 0,025% de 3,3,9-

hidrocloro de diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Steinheim, Alemanha). Após estes procedimentos, as secções foram adequadamente lavadas em PBS 0,1 M e montadas em lâminas previamente gelatinizadas. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram cobertas com *Permout* (Fisher Scientific, New Jersey, EUA) e lamínulas.

Para a detecção de DCX, os cortes foram submetidos a sucessivas lavagens em PBS 0,1 M acrescido de Triton-X 100 0,15%, as secções foram incubadas com 4% BSA em PBS 0,1 M acrescido de Triton-X 100 0,15% durante 60 min para o bloqueio de reações inespecíficas. As secções foram, então, incubadas com anticorpo *goat* anti-DCX (1:300, Santa Cruz Biotechnology) em solução de PBS 0,1 M acrescido de Triton-X 100 0,15%, contendo 2% de BSA e 0,02% de Thiomerosal (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Steinheim, Alemanha) e foram mantidas sob agitação constante durante 24 horas. Após este período, as secções foram lavadas com PBS 0,1 M acrescido de Triton-X 100 0,15% e, então, incubadas com o anticorpo secundário *goat anti-rabbit* biotinizado (1:500, Santa Cruz Biotechnology) na mesma solução utilizada para o anticorpo primário por 2 horas. Posteriormente, foram incubadas com o complexo ABC por mais 2 horas. A revelação foi realizada usando 0,025% de DAB. Após estes procedimentos, as secções foram adequadamente lavadas em PBS 0,1 M acrescido de Triton-X 100 0,15% e montadas em lâminas previamente gelatinizadas. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram cobertas com *Permout* e lamínulas.

### **3.7. Análise quantitativa**

As células positivas para BrdU foram manualmente contadas em 6-8 secções representativas do hipocampo, escolhidas aleatória e sistematicamente, com distância de 200  $\mu\text{m}$  entre elas (LIU *et. al.*, 1998), correspondendo a toda extensão hipocampal (coordenadas de -2,80 a -4,52 do Bregma (PAXINOS & WATSON, 1998)). A área do giro denteado, expressa em  $\text{mm}^2$ , foi obtida com o auxílio do programa *AxioVision* que permite ao experimentador delinear, com o cursor e o auxílio do *mouse*, qualquer área que desejar. A densidade de células BrdU-positivas em cada secção foi calculada dividindo o número de núcleos BrdU-positivos pela área do GD (LIU *et. al.*, 1998). O

resultado final foi expresso como a média  $\pm$  desvio padrão da densidade de células BrdU-positivas encontradas nas 6-8 secções avaliadas de cada animal.

As células positivas para DCX foram contadas manualmente por toda a extensão do GD de ambos os hemisférios de 2-3 secções (KEITH *et. al.*, 2008) correspondentes às coordenadas estereotáxicas de -3,6 a -4,3 do Bregma (PAXINOS & WATSON, 1998).

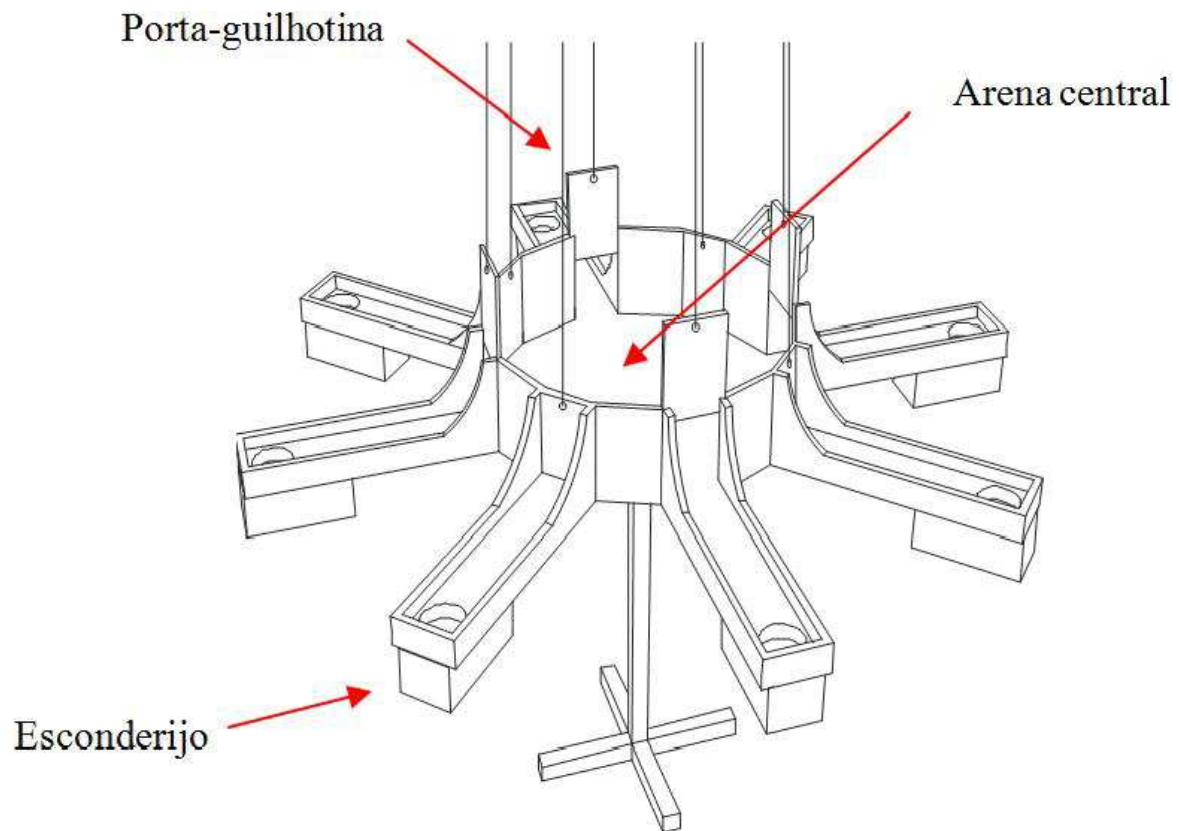
### **3.8. O labirinto radial aversivo de 8 braços (LRA)**

O LRA caracteriza-se por um equipamento de madeira contendo 8 braços com sistema de confinamento, como proposto por Paganelli e colaboradores (2004). Os braços (55 cm x 15 cm) se projetam a partir de uma plataforma poligonal de 16 lados (arena central, 71 cm transversal), estando os braços dispostos alternadamente em relação às faces do polígono (Figura 6). A comunicação dos braços com a arena central tem trânsito livre entre essas partes do labirinto. São feitas portas tipo guilhotina em acrílico transparente que são controladas pelo experimentador atrás de um sistema de roldanas. Ao final de cada braço, uma abertura (11,2 cm de diâmetro) permite o acesso do animal a uma caixa escura (23 x 11 x 9,5 cm) localizada logo abaixo de cada orifício, a qual pode ser inserida e removida como uma gaveta abaixo, servindo como um refúgio para o animal em relação às áreas iluminadas do labirinto. Dentre os 8 braços, somente um contém um refúgio verdadeiro. Nos demais braços, os esconderijos são de fundo falso. Nas bordas de cada braço, uma parede, também de acrílico transparente (2,5 cm), previne uma eventual queda do animal. O labirinto encontra-se elevado a 90 cm do solo, podendo ser livremente girado em qualquer sentido.

Várias pistas tridimensionais extra-labirinto ficaram dispostas na sala (porta fechada, janela e alguns objetos tridimensionais). Um pequeno circulador de ar ficou localizado no chão, gerando um ruído de fundo constante na sala de experimentação. Duas lâmpadas incandescentes (200 W) e um par de lâmpadas fluorescentes (40 W) foram fixadas no teto, a uma altura de 1,80 m da plataforma do labirinto. Uma câmera de vídeo posicionada na porta de entrada da sala foi usada para que o experimentador tivesse controle de acesso do animal aos braços e para gravar o comportamento dos animais, possibilitando, posteriormente, a análise e a quantificação de seu desempenho.

Os animais foram submetidos ao LRA por 13 dias consecutivos. Desses 13 dias, o primeiro correspondeu à habituação ao local e os outros 12 dias, ao treino propriamente dito. Assim, no primeiro dia, os animais foram individualmente colocados na arena central, por 4 minutos, com todas as portas guilhotina abertas para que eles explorassem todos os braços, reconhecendo o novo ambiente e aprendendo a encontrar o verdadeiro esconderijo existente em apenas um dos braços. Durante os 12 dias de treino, os ratos foram submetidos a três tentativas, também iniciadas sempre pela arena central, de, no máximo, 4 minutos cada. O fim das tentativas se deu no momento em que os ratos encontraram a gaveta com fundo verdadeiro, correspondendo ao tempo de latência.

Foram registrados: *i*) latência (tempo despendido pelo animal da arena central até o esconderijo), *ii*) erros de referência (número de entradas nos braços sem o esconderijo) e *iii*) erros operacionais (número da repetição da entrada em um dos braços sem o esconderijo).



**Figura 6:** Esquema representativo do LRA.

### **3.9. Análise estatística**

#### **3.9.1. Quantificação das células BrdU e DCX-positivas**

Os dados foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias. Para todos os estudos, foram utilizados o teste t de *Student* ou a análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*) seguida do teste *post hoc* de Tukey, admitindo  $P < 0,05$  como critério para significância estatística.

#### **3.9.2. Análise comportamental no LRA**

Os resultados referentes à latência, ao número de erros de referência e ao número de erros operacionais foram expressos como a média das 3 tentativas, às quais os animais foram submetidos todos os dias de treino.

Os dados brutos foram transformados em logaritmo para fins de homogeneização da variância. Foi utilizada a análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*) para Amostras Repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni para amostras desiguais a fim de localizar quais tratamentos eram diferentes entre si nos parâmetros “diários”. Os fatores analisados foram *Grupo* (tratamento) e *Tempo* (dias de re-testes). A significância estatística foi definida para um valor de  $P < 0,05$ .

Para os parâmetros de “médias totais”, foi utilizada a análise de variância de Kruskal-Wallis, seguida pelo teste *post-hoc* de Dunn para comparação múltipla a fim de localizar quais tratamentos eram diferentes entre si. A significância estatística foi definida para um valor de  $P < 0,05$ . O desempenho cognitivo medido no período pré-isquemia (fase de treino) foi comparado ao desempenho observado após a isquemia (fase de retenção) através do teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras dependentes. A significância estatística também foi definida para um valor de  $P < 0,05$ .

## **4. Resultados**

### **4.1. Experimento 1**

A Figura 8 mostra a distribuição de células BrdU-positivas no GD de ratos submetidos ou não à ICGT. Os núcleos das células BrdU-positivas corados aparecem escuros e distribuídos uniformemente pela camada celular da ZSG e no hilus do hipocampo, onde são tipicamente encontrados e, freqüentemente, aparecem agrupados ou em *clusters* (Figura 8C).

Um aumento significativo na densidade, ou seja, número de células BrdU-positivas/mm<sup>2</sup>, foi observado (Figura 8 B, C e D) no GD de ratos adultos 7 dias após a

ICGT ( $443,6 \pm 85,3$  células BrdU-positivas/  $\text{mm}^2$ ) quando comparado ao grupo *sham* (Figura 8 A e D;  $138,5 \pm 19,49$  células BrdU-positivas/  $\text{mm}^2$ ) (teste t de *Student*,  $P=0,0011$ ;  $t=4,1$ ;  $df=10$ ).

## 4.2. Experimento 2

O efeito do tratamento crônico com imipramina sobre a proliferação celular (BrdU) na ZSG do hipocampo de ratos submetidos à ICGT pode ser observado na Figura 9. Os animais do grupo isquemia (15 dias) + imipramina apresentaram um aumento significativo na densidade de células BrdU-positivas ( $213,80 \pm 26,55$  células BrdU-positivas/  $\text{mm}^2$ ) no GD, quando comparados aos grupos *sham* + imipramina ( $110,10 \pm 15,61$  células BrdU-positivas/  $\text{mm}^2$ ) ou *sham* + salina ( $138,50 \pm 19,49$  células BrdU-positivas/  $\text{mm}^2$ ) ( $F_{3,27}=10,07$ ;  $P=0,0002$ ). O grupo isquemia (15 dias) + imipramina mostrou-se ainda diferente do grupo isquemia (15 dias) + salina ( $72,70 \pm 9,56$  células BrdU-positivas/  $\text{mm}^2$ ) (Tukey,  $P<0,0001$ ). Não foi observada diferença significativa entre o grupo de animais *sham* + salina ( $138,50 \pm 19,49$  células BrdU-positivas/  $\text{mm}^2$ ) e *sham* + imipramina ( $110,10 \pm 15,61$  células BrdU-positivas/  $\text{mm}^2$ ) (Tukey,  $P>0,05$ ).

A expressão de células DCX-positivas no GD 15 dias após a ICGT foi utilizada para avaliar o efeito do tratamento crônico com imipramina na geração de neuroblastos (neurogênese, Figura 10). A ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey mostrou um aumento significativo na quantidade de células DCX-positivas no GD dos grupos isquemia (15 dias) + salina ( $353,20 \pm 22,32$  células DCX-positivas/ GD) e isquemia (15 dias) + imipramina ( $295,80 \pm 55,88$  células DCX-positivas/ GD) quando comparada aos grupos *sham* + salina ( $23,56 \pm 23,56$  células DCX-positivas/ GD) e *sham* + imipramina ( $73,42 \pm 35,34$  células DCX-positivas/ GD) ( $F=19,44$ ;  $P<0,0001$ ) (Figura 10).

## 4.3. Experimento 3

### 4.3.1. Avaliação da sobrevivência e da neurogênese

A Figura 11 mostra que todos os grupos são estatisticamente iguais quanto ao número de células DCX-positivas avaliadas em cada um deles, ou seja, o número de

células DCX-positivas no GD dos animais pertencentes ao grupo isquemia (30 dias) + imipramina ( $53,54 \pm 8,92$  células DCX-positivas/ GD) não foi estatisticamente diferente do número de células DCX-positivas do grupo isquemia (30 dias) + salina ( $73,64 \pm 10,60$  células DCX-positivas/ GD). O mesmo resultado foi obtido quando se comparou o número de células DCX-positivas do grupo isquemia (30 dias) + imipramina ( $53,54 \pm 8,92$  células DCX-positivas/ GD) quando comparado aos grupos *sham* + imipramina ( $69,80 \pm 7,39$  células DCX-positivas/ GD) e *sham* + salina ( $87,58 \pm 6,30$  células DCX-positivas/ GD) ( $F_{3,19}=2,73$ ;  $P=0,0778$ ).

#### 4.3.2. Avaliação comportamental

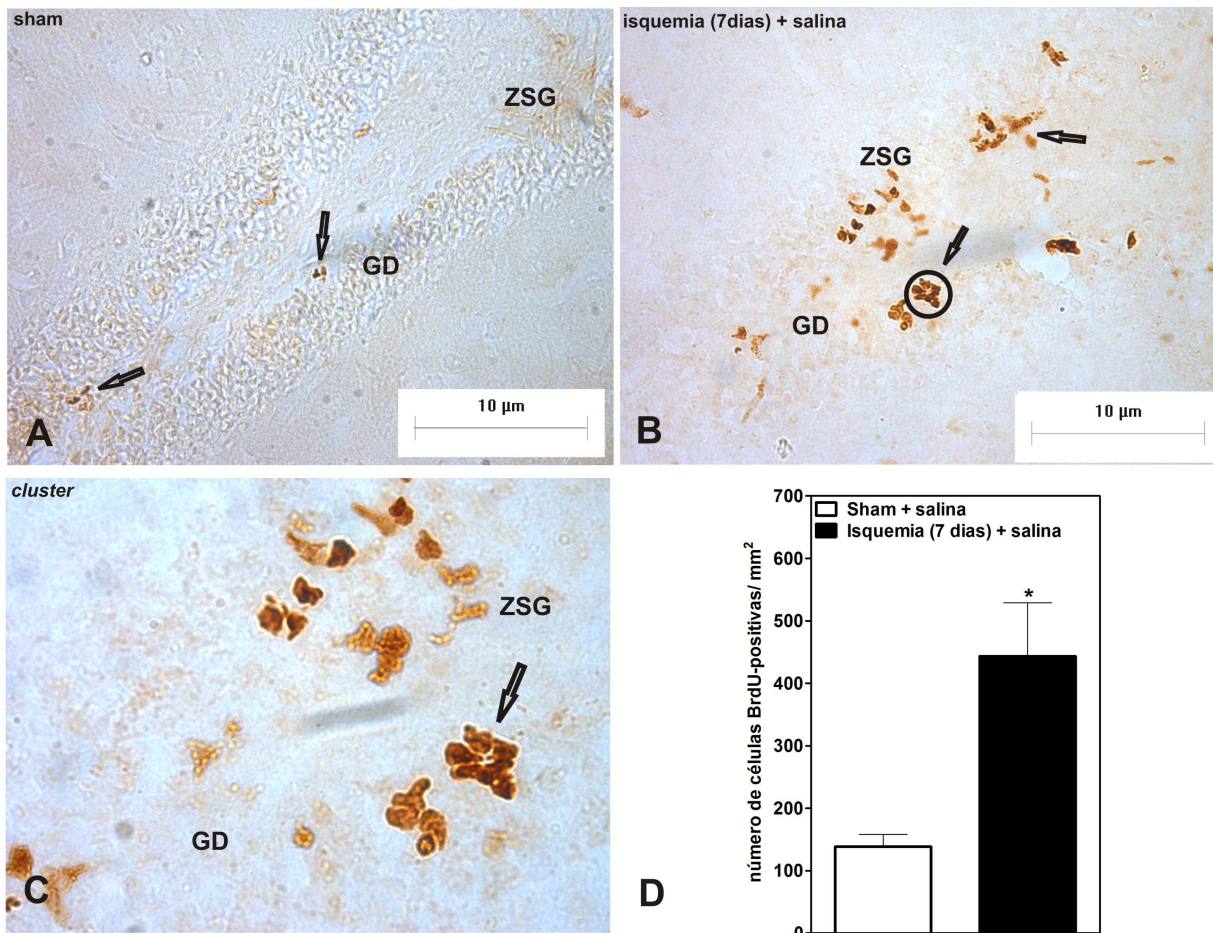
A Figura 12 mostra o efeito do tratamento crônico com o antidepressivo imipramina sobre a amnésia retrógrada medida no LRA. Na fase pré-isquêmica (treino), considerou-se como desempenho basal o valor médio da latência e número de erros medidos nos três últimos dias de treinamento (dias -3 a -1). Nesta fase, não houve diferença significativa entre os *Grupos* ou dentro dos *Grupos*. A capacidade de retenção (memória) da cognição adquirida durante o treino foi examinada 16, 23 e 30 dias após a isquemia. O tratamento com salina (0,1 mL/Kg) ou imipramina (20 mg/Kg) foi realizado durante 14 dias antes do primeiro teste de retenção (Esquema 3).

Ao examinar o desempenho de retenção medido diariamente (painel superior), a ANOVA para medidas repetidas revelou um efeito global de *Grupo* (tratamento) altamente significativo para todos os parâmetros estudados, ou seja, latência ( $F_{2,74}=8,92$ ;  $P=0,00069$ ), número de erros de referência ( $F_{2,74}=6,09$ ;  $P=0,0052$ ) e número de erros operacionais ( $F_{2,74}=3,66$ ;  $P=0,035$ ). Nenhum efeito de *Tempo* (dias de testes) ( $F_{2,74}=0,033$  a  $2,17$ ;  $P>0,05$ ) ou interação *Tempo vs. Grupo* ( $F_{4, 74}=0,95$  a  $2,17$ ;  $P>0,05$ ) foi observado para qualquer um dos parâmetros analisados. O teste *post hoc* de Bonferroni revelou que a ICGT prejudicou significativamente o desempenho de retenção do grupo tratado com salina, conforme medido pelos parâmetros latência e erros operacionais (painel superior:  $*P=0,0012$  a  $0,016$ , grupo isquemia + salina vs. grupo *sham* + salina). O número diário de erros de referência também aumentou após a ICGT, porém, com um nível de significância marginalmente acima dos 5% ( $P= 0,058$ , grupo isquemia + salina vs. grupo *sham* + salina). Esse efeito amnésico da ICGT

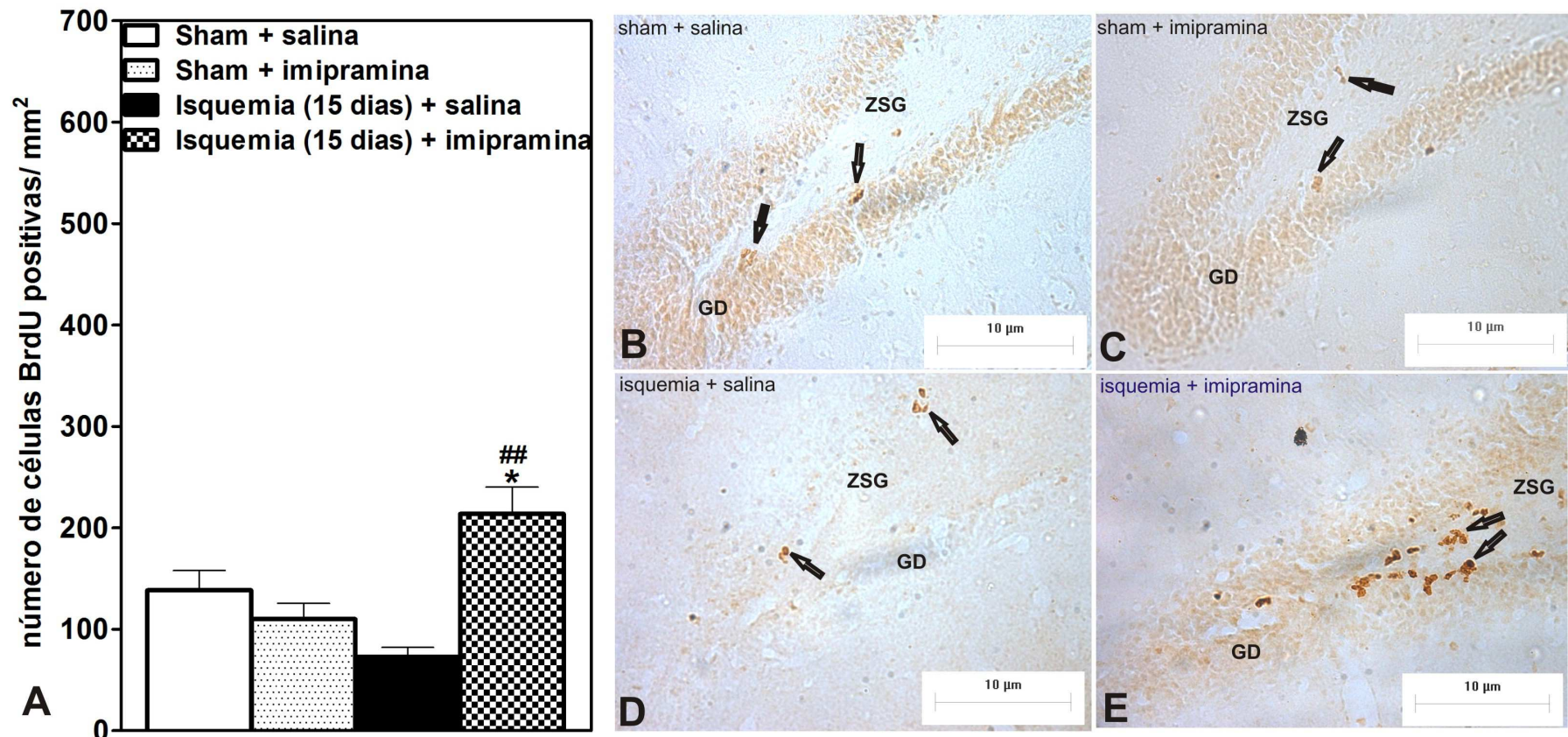


também se mostrou bastante evidente quando se considerou a média total da latência e a média total dos erros, calculadas entre os três testes de retenção (painel inferior). Para esta forma de apresentação dos resultados, a ANOVA de Kruskal-Wallis (não paramétrica) foi usada para quantificação da resposta comportamental. Por esta análise, um efeito de *Grupo* altamente significativo também foi observado para todos os três parâmetros analisados (efeito global de *Grupo*:  $K-W=7,16$  a  $12,18$ ;  $P=0,028$  a  $0,0016$ ). O teste *post hoc* de Dunn revelou um déficit de retenção nos animais submetidos à isquemia e tratados com salina (painel inferior:  $*P<0,05$ , grupo isquemia + salina vs. grupo *sham* + salina). Este efeito amnésico da isquemia não foi alterado pelo tratamento com o antidepressivo imipramina medido diária (painel superior:  $\#P=0,0041$  para  $0,016$ ; grupo isquemia + imipramina vs. grupo *sham* + salina;  $P>0,05$ , grupo isquemia + imipramina vs. grupo isquemia + salina) ou cumulativamente (painel inferior:  $\#P<0,05$ ; grupo isquemia + imipramina vs. grupo *sham* + salina;  $P>0,05$ , grupo isquemia + imipramina vs. grupo isquemia + salina).

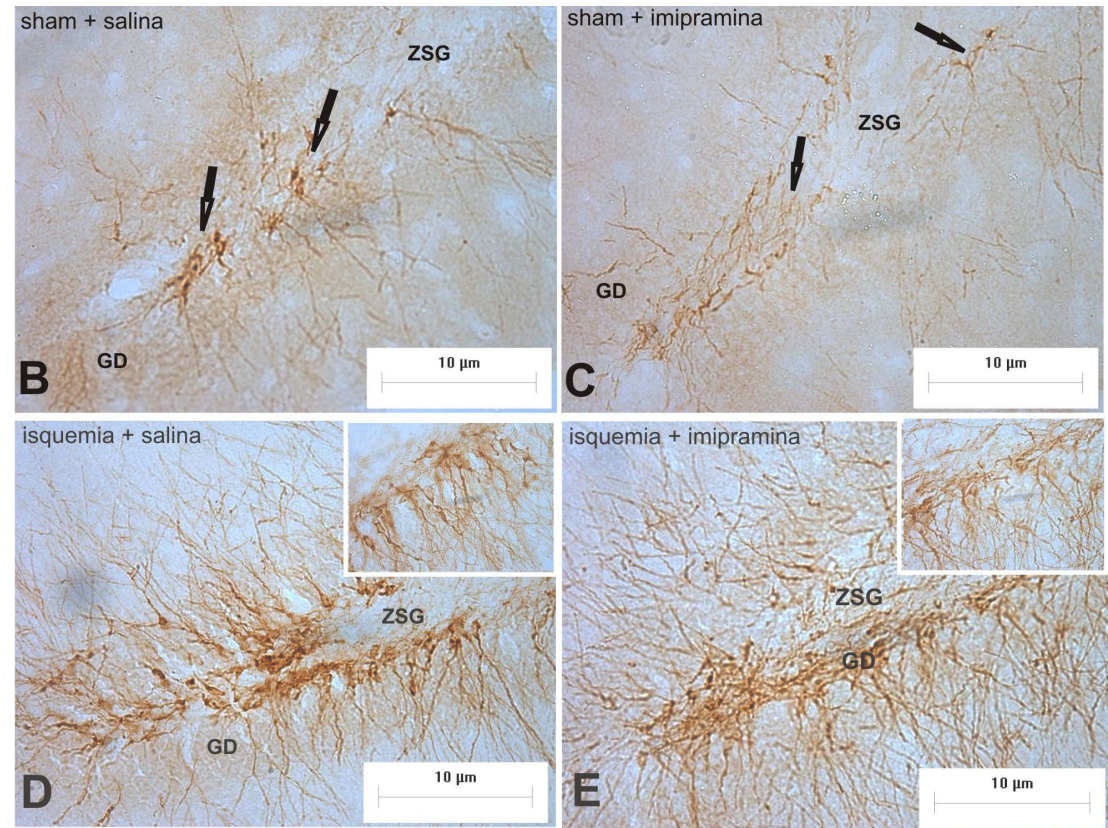
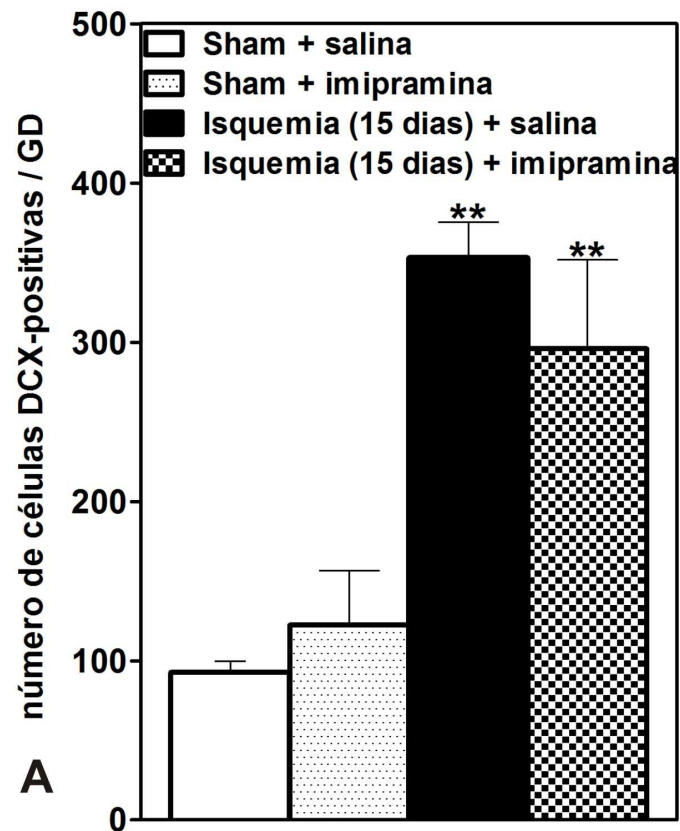
Como uma análise adicional dos dados dos testes de retenção, o desempenho cognitivo medido no período pré-isquemia (fase de treino) foi comparado ao desempenho observado após a isquemia (fase de retenção). O teste de Wilcoxon revelou que todos os parâmetros aumentaram significativamente da fase pré para a fase pós-isquemia no grupo isquemia + salina (painel inferior:  $\$P<0,011$  a  $0,038$ ), indicando, mais uma vez, o efeito amnésico da ICGT. Também através desta análise, observou-se que a imipramina não alterou o efeito amnésico da ICGT ( $P>0,05$ ; grupo isquemia + imipramina vs. grupo isquemia + salina;  $^+P<0,05$ , isquemia + imipramina pós vs. isquemia + imipramina pré).



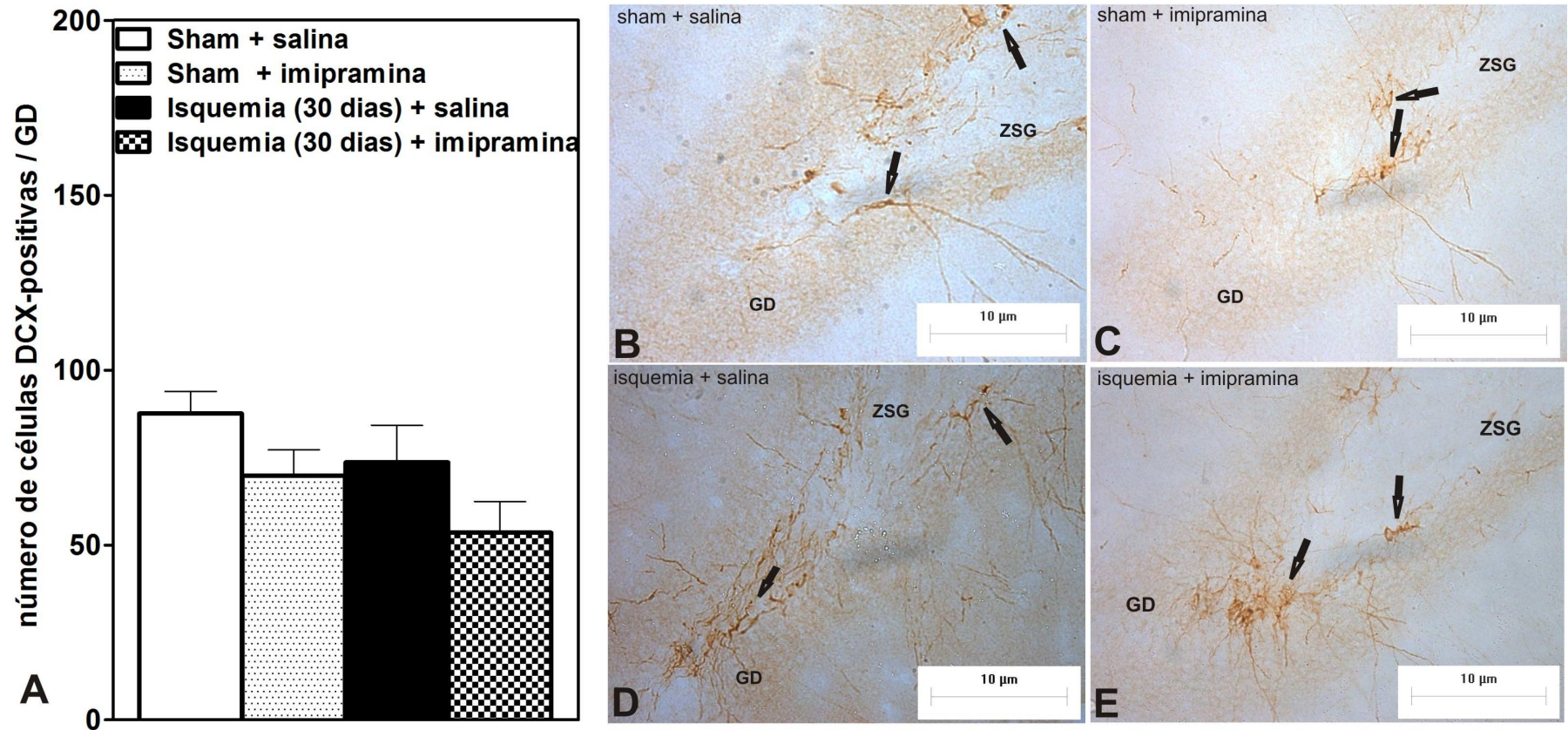
**Figura 8: Aumento da proliferação celular na ZSG do hipocampo de ratos após 7 dias de ICGT.** No oitavo dia após a ICGT, os animais ( $n = 5-7$ ) receberam injeções de BrdU (50 mg/Kg, *i.p.*, 4 vezes ao dia). Vinte e quatro horas após, os animais foram sacrificados e tiveram seus cérebros removidos para posterior detecção imunohistoquímica do BrdU. A e B= fotomicrografias (aumento de 40X) representativas do GD de animais *sham* e isquêmicos, respectivamente (as setas indicam as células BrdU-positivas). C= As células em proliferação aparecem agrupadas ou em *clusters* (células circuladas em B e as indicadas pela seta em C com aumento de 100X). D= densidade das células BrdU-positivas no GD de ratos. As colunas representam as médias e as barras verticais, os erros padrões médios  $*P < 0,05$  (teste t de *Student*).



**Figura 9: Efeito do tratamento crônico com imipramina sobre a proliferação celular na ZSG do hipocampo de ratos submetidos à ICGT.** No segundo dia após a ICGT, os animais (n =5-7) receberam injeções diárias de imipramina (20 mg/ Kg, *i.p.*, 14 dias) e 24 horas após a última administração, foram injetados com BrdU (50 mg/ Kg, *i.p.*, 4 vezes ao dia). A= Densidade das células BrdU-positivas no GD de ratos. \* $P < 0,05$  (isquemia + imipramina vs. *sham* + salina e *sham* + imipramina); ## $P < 0,001$  (isquemia + imipramina vs. isquemia + salina) (ANOVA seguida de teste *post hoc* de Tukey). B, C, D e E= Fotomicrografias (aumento de 40X) representativas do GD de animais *sham* tratados com salina (B) ou imipramina (C) e animais isquêmicos tratados com salina (D) ou imipramina (E) (as setas indicam as células BrdU-positivas).

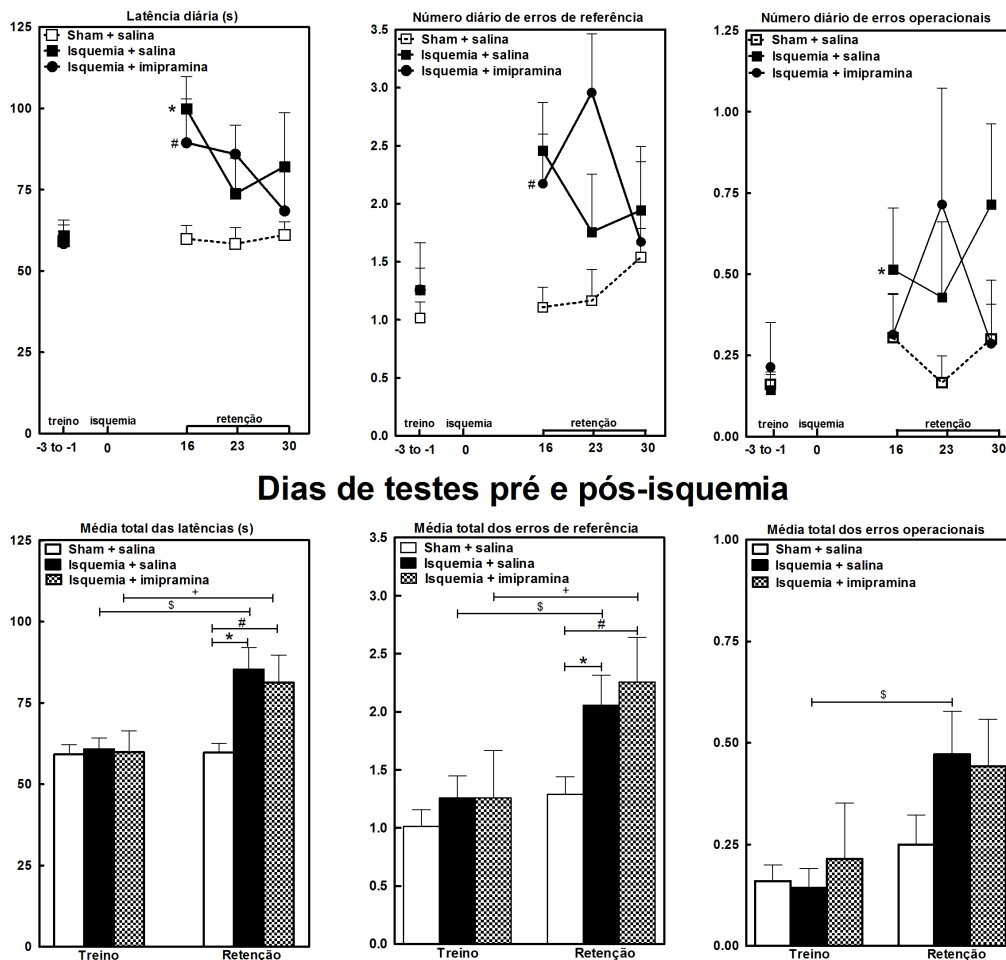


**Figura 10: Efeito do tratamento crônico com imipramina sobre a neurogênese na ZSG do hipocampo de ratos 15 dias após serem submetidos à ICGT.** A= Densidade das células DCX-positivas na ZSG do hipocampo 15 dias após a ICGT e tratamento crônico com imipramina (14 dias, *i.p.*). **\*\* $P < 0,001$**  (isquemia (15 dias) + salina e isquemia (15 dias) + imipramina vs. *sham* + salina e *sham* + imipramina) (ANOVA seguida de teste *post hoc* de Tukey). B e C= Fotomicrografias representativas do GD de animais ( $n = 5-7$ ) *sham* tratados com salina e imipramina (aumento de 20X), respectivamente. D e E= Fotomicrografias representativas do GD de animais ( $n = 5-7$ ) isquêmicos (15 dias) tratados com salina e imipramina (aumento de 20X), respectivamente. As setas indicam as células DCX-positivas. Os detalhes em D e E mostram algumas células DCX-positivas em aumento de 100X.



**Figura 11: Ausência de efeito do tratamento crônico com imipramina sobre a neurogênese na ZSG do hipocampo de ratos 30 dias após serem submetidos à ICGT.** A= Densidade das células DCX-positivas na ZSG do hipocampo após 30 dias da ICGT e tratamento crônico com imipramina (14 dias, *i.p.*) (ANOVA seguida de teste *post hoc* de Tukey). B e C= Fotomicrografias representativas do GD de animais (n =5-7) *sham* tratados com salina e imipramina, respectivamente. D e E= Fotomicrografias representativas do GD de animais (n =5-7) isquêmicos (30 dias) tratados com salina e imipramina, respectivamente. As setas indicam as células DCX-positivas.





**Figura 12: Efeito do tratamento crônico com imipramina (20 mg/ Kg, *i.p.*) sobre o déficit de retenção (amnésia) causado pela ICGT.** Ratos intactos ( $n=7-10$ ) foram treinados durante 12 dias e, posteriormente, submetidos à ICGT ou à falsa isquemia (*sham*). Vinte e quatro horas após a isquemia iniciou-se o tratamento crônico com salina ou imipramina por 14 dias consecutivos. Os testes de retenção da cognição adquirida antes da isquemia (treino) foram realizados 16, 23 e 30 dias após a isquemia. O painel superior mostra a distribuição temporal dos vários parâmetros comportamentais. Na fase pré-isquêmica, os parâmetros de latência e número de erros são expressos pela média dos últimos três dias de treino (dias -3 a -1). A latência média total e o número médio total de erros (acumulados ao longo dos últimos 3 dias de treino e durante os três testes de retenção) estão representados no painel inferior. A capacidade de retenção (memória) foi profundamente prejudicada pela ICGT ( $*P<0,001 - 0,05$ ; grupo isquemia + salina vs. grupo *sham* + salina). O tratamento com imipramina não reduziu a amnésia provocada pela isquemia ( $P>0,05$ ; grupo isquemia + imipramina vs. grupo isquemia + salina;  $\#P<0,01 - 0,05$ ; grupo isquemia + imipramina vs. grupo *sham* + salina). O efeito amnésico também é evidente quando se compara o desempenho medido nas fases pré e pós-isquemia (Painel inferior:  $\$P<0,05$  isquemia + salina pós vs. isquemia + salina pré;  $*P<0,05$ ; isquemia + imipramina pós vs. isquemia + imipramina pré).

## 5. Discussão

A proliferação celular e a neurogênese no GD de ratos adultos são processos dinamicamente regulados por diversos fatores. Este estudo foi conduzido para determinar se o tratamento crônico com o antidepressivo imipramina incrementa a resposta neurogênica hipocampal e melhora a recuperação funcional de ratos submetidos à ICGT.

Os resultados obtidos mostraram que a taxa de proliferação celular aumentou no 7º dia após a ICGT e retornou ao seu nível basal no 15º dia após a ICGT. O tratamento crônico com imipramina resultou em significativo aumento da taxa de proliferação 15 dias após a ICGT. Em paralelo, observamos aumento no número de células DCX-positivas, representativo da presença de neurônios imaturos no GD de animais submetidos à ICGT, tratados ou não com a imipramina. Neste estudo, a capacidade de retenção (memória) dos animais foi profundamente prejudicada pela ICGT. O efeito amnésico ficou evidente quando se comparou o desempenho medido nas fases pré e pós-isquemia. O tratamento com imipramina não reduziu a amnésia provocada pela ICGT ou provocou qualquer alteração comportamental nos animais.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com outros trabalhos que demonstram que a ICGT estimula a proliferação celular no GD, com picos entre 7 e 10 dias, retornando ao seu nível basal em 2 ou 4 semanas após a ICGT (LIU *et al.*, 1998; YAGITA *et al.*, 2001; KAWAI *et al.*, 2004). Como o BrdU é um indicador de síntese de DNA, sua incorporação ao novo DNA formado pode ocorrer não apenas na fase S do ciclo celular que antecede a divisão celular (NOWAKOWSKI *et al.*, 1989), mas também durante o processo de reparo de DNA (RAKIC, 2002). Uma vez que a ICGT leva a um aumento nos danos do DNA celular (LIU *et al.*, 2001), a possibilidade de incorporação de BrdU pelas células em processo de reparo de DNA deve ser considerada. Células BrU-positivas foram observadas tipicamente na ZSG do GD de ratos 7 dias depois da ICGT, o que sugere que a incorporação de BrdU ocorreu durante a proliferação de células progenitoras e não como resultado de um processo de reparo (CAMERON & MCKAY, 2001).

O decréscimo do número de células BrdU-positivas observado 15 dias após a isquemia é esperado, uma vez que a proliferação celular induzida pela isquemia é um



fenômeno transitório (LICHTENWALNER & PARENT, 2006). Na verdade, muitos neurônios recém formados morrem algumas semanas após a isquemia, enquanto que a maioria dos sobreviventes diferencia-se em neurônios granulares (LIU *et al.*, 1998; KAWAI *et al.*, 2004). De acordo, observou-se um aumento do número de células DCX-positivas no GD 15 dias após a ICGT, o que confirma a natureza neuronal dessas células. Embora o papel da neurogênese hipocampal ainda não esteja totalmente esclarecido, diversos estudos demonstram que os novos neurônios formados após o insulto isquêmico migram para regiões cerebrais danificadas (SCHMIDT & REYMAN, 2002; ZHANG *et al.*, 2007) onde se tornam ativamente integrados ao circuito hipocampal existente e formam sinapses apropriadas, contribuindo, assim, para a melhoria de déficits neurológicos e para a formação da memória (NAKATOMI *et al.*, 2002; BENDEL *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2009). Neste sentido, Raber e colaboradores (2004) demonstraram que a ablação de células precursoras de neurônios por radiação, piora o quadro da isquemia cerebral, sugerindo que as células recém-geradas podem ser, de fato, funcionais.

Alguns estudos demonstram que o tratamento crônico (14 dias) com a imipramina *per se* promove a proliferação e a diferenciação de células no GD de ratos adultos (TAMAKI *et al.*, 2008; MURRAY *et al.*, 2008). No presente estudo, entretanto, o tratamento com imipramina por 14 dias não resultou em qualquer efeito sobre a proliferação celular em animais *sham* operados, apesar de o protocolo de tratamento crônico ter sido baseado em outros trabalhos descritos anteriormente (MANEV *et al.*, 2001; SAIRANEN *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2007; PECHNICK *et al.*, 2008). De fato, é difícil interpretar a ausência deste efeito. Choi e colaboradores (2007) demonstraram que os animais tratados durante 21 dias com a fluoxetina e analisados 28 dias após a injeção de BrdU (75 mg/ Kg, no 7º dia após o início do tratamento) também não apresentaram novas células em proliferação no GD. Por outro lado, o tratamento com fluoxetina por 7 dias aumentou a neurogênese após a hipóxia isquêmica (CHANG *et al.*, 2006). Portanto, uma possibilidade é que seja necessário um tratamento mais prolongado com o antidepressivo para que se possa observar um aumento significativo sobre a proliferação celular. Recentemente, Li e colaboradores (2009) demonstraram que é necessário um tratamento de, pelo menos, 28 dias com a fluoxetina para se

observar a proliferação e a sobrevivência de novas células no hipocampo de ratos que sofreram isquemia focal. É importante lembrar, entretanto, que um aumento significativo na densidade de células BrdU-positivas foi observado, no presente estudo, quando se combinou o tratamento crônico com a imipramina e a ICGT.

Os mecanismos básicos que explicam o efeito da imipramina sobre a proliferação celular após a ICGT não são totalmente compreendidos. Larsen e colaboradores (2008) forneceram evidências de que o tratamento crônico com a imipramina (10 mg/ Kg, 14 dias) aumentou a expressão dos RNAm do BDNF e da sinaptofisina no hipocampo de ratos, indicando que este tratamento antidepressivo induziu a reorganização neural. De acordo, outro estudo provou que o tratamento crônico com a imipramina (15 mg / Kg, 21 dias) aumenta a expressão de proteínas associadas à plasticidade neural, como a forma polissializada da molécula de adesão da célula nervosa (PSA-NCAM) e a proteína 43 associada ao crescimento (GAP-43), confirmando que este antidepressivo não só está envolvido na reorganização neural como também é responsável pela plasticidade sináptica no hipocampo (SAIRANEN *et al.*, 2007). É possível que os efeitos da imipramina sobre a plasticidade neural contribuam para o aumento da proliferação celular observado após a ICGT no presente trabalho, embora outros fatores, como a ação neuroprotetora da imipramina (HWANG *et al.*, 2008; PENG *et al.*, 2008), por exemplo, possa também estar envolvida.

A DCX é uma proteína associada aos microtúbulos que é expressa transitoriamente em todos os neuroblastos do SNC (COUILLARD-DESPRES *et al.*, 2005). No cérebro adulto, a expressão de DCX é mantida em áreas de neurogênese contínua, como a ZSG do hipocampo. A expressão de DCX inicia-se quando os neuroblastos são gerados, com picos durante a segunda semana, retornando ao nível basal concomitante ao aparecimento de marcadores de células neuronais maduras (VON BOHLEN, 2007). Em média, a fase de expressão da DCX parece durar 3 semanas, quando esta expressão passa a ser ausente nos neurônios maduros (PLÜMPE *et al.*, 2006). De acordo com este estudo, observou-se um aumento no número de células DCX-positivas 15 dias após a ICGT e um retorno ao nível basal 30 dias após a ICGT. Esse efeito foi interpretado como um resultado da dinâmica da expressão de DCX nas diferentes fases da maturação neuronal.

Como discutido anteriormente, o tratamento crônico durante 14 dias com a imipramina estimula a neurogênese após a ICGT, em um período em que a resposta neurogênica à ICGT não é diferente dos animais *sham* operados (KAWAI *et al.*, 2004). Esta pode ser uma indicação de que a imipramina promoveu a sobrevivência das células proliferativas inicialmente formadas após o insulto isquêmico. No entanto, se tal efeito poderia ser sustentado até o final dos testes comportamentais (30 dias após a ICGT), não foi possível ser analisado no presente estudo, uma vez que houve completa ausência de células BrdU-positivas em todos os grupos de animais submetidos ao teste comportamental. É difícil encontrar uma explicação para esse resultado, mas, uma possível interpretação é que tenha ocorrido algum problema técnico durante os experimentos que impediu a expressão do BrdU. Embora a administração sistêmica de BrdU seja a técnica mais utilizada para detectar a proliferação e a sobrevivência celular, este simples procedimento apresenta algumas desvantagens. Primeiramente, é interessante lembrar que, em ratos, as células em divisão na ZSG do GD permanecem em fase S durante 9,5 horas, o que compreende cerca de 40% da duração do ciclo celular (CAMERON & MCKAY, 2001), e, o BrdU permanece disponível para incorporação ao DNA celular apenas durante 15 minutos após ser administrado por via sistêmica (MANDYAM *et al.*, 2007). O BrdU deve ainda, ultrapassar a BHE para ser incorporado ao DNA celular, ou seja, a taxa de incorporação do BrdU para células em proliferação é dependente da integridade da BHE. Neste sentido, tratamentos que perturbem ou interrompam a função da BHE, como lesões por kainato, epilepsia ou a própria isquemia cerebral (PARDRIDGE *et al.*, 1975; CORNFORD & OLDENDORF, 1986; BOLTON & PERRY, 1998) podem tanto promover quanto dificultar a incorporação do BrdU pelas células do SNC. Portanto, para que a incorporação do BrdU ocorra com eficiência, altas concentrações desta substância são necessárias para marcar as células na fase S do ciclo celular no GD hipocampal (CAMERON & MCKAY, 2001). É importante levar em conta que se administrado em doses elevadas o BrdU pode ser tóxico; ao contrário, se o BrdU for administrado em doses insaturadas, pode resultar em incorporação parcial ou incoerente pelas novas células (COUILLARD-DESPRES *et al.*, 2005). Assim, a ausência da marcação com o BrdU após 15 dias de tratamento crônico com imipramina ou 30 dias após a ICGT observada no presente

estudo, pode ser reflexo, ao menos em parte, dos procedimentos cirúrgicos utilizados, dosagem e/ou intervalos de tempo da administração do BrdU, apesar de ter sido seguido o protocolo de administração de BrdU observado no estudo de Choi e colaboradores (2007).

Portanto, não foi possível concluir se o efeito negativo da imipramina sobre a cognição ocorreu devido à ausência de neurogênese 30 dias após a ICGT. Contudo, é possível que a administração de imipramina durante 14 dias não tenha sido suficiente para promover uma resposta neurogênica duradoura, com uma conseqüente resposta comportamental. Essa observação está de acordo com alguns estudos que utilizam o mesmo período de tratamento crônico com a fluoxetina (CHANG *et al.*, 2006; CHOI *et al.*, 2007). A falha da imipramina em reverter a amnésia retrógrada causada pela ICGT está de acordo com alguns relatos anteriores, como o de Windle e Corbett (2005), que demonstraram que o tratamento crônico com a fluoxetina (10 mg/ Kg, 14 dias) não resulta em melhora dos déficits motores causados pela isquemia focal em ratos. Neste estudo, tratamento com a fluoxetina foi realizado durante 14 dias após o treinamento dos ratos. Da mesma forma, Li e colaboradores (2009) demonstraram que o tratamento crônico com a fluoxetina após o insulto isquêmico, não reverteu os déficits cognitivos e as alterações sensoriais resultantes da injúria isquêmica. No entanto, quando a fluoxetina foi administrada durante 28 dias após a isquemia focal, os déficits cognitivos foram reduzidos, bem como, a taxa de sobrevivência dos neurônios recém-formados foi elevada (LI *et al.*, 2009). Além disso, o bloqueio da neurogênese pelo AZT (3-azido-deoxitimidina) anulou o efeito benéfico da fluoxetina no teste comportamental, indicando que a neurogênese induzida pela fluoxetina contribuiu para a recuperação comportamental dos animais (LI *et al.*, 2009). Em conjunto, esses dados sugerem que a duração do tratamento farmacológico com antidepressivos pode ser crucial para a recuperação funcional baseada na neurogênese após a injúria isquêmica cerebral. Se o perfil neurogênico da imipramina for similar ao da fluoxetina, então, é provável que o tratamento crônico de 14 dias com a imipramina não seja suficiente para promover uma taxa de sobrevivência adequada daquelas células formadas até o sétimo dia após o insulto isquêmico cerebral e, conseqüentemente, o efeito da imipramina sobre a cognição pode não ser expresso.

Em conclusão, o presente estudo mostrou que a imipramina promove a resposta neurogênica hipocampal à ICGT, um efeito que não foi acompanhado pela recuperação cognitiva. Estudos adicionais serão necessários para avaliar se o tratamento crônico por um período maior será capaz de melhorar tanto o desempenho de aquisição (aprendizagem) quanto o desempenho da retenção (memória) após a ICGT e sua relação com a neurogênese hipocampal.

## **6. Referências**

ALVAREZ-BUYLLA A & GARCIA-VERDUGO JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci.* 2002; 22(3):629-634.

ARVIDSSON A, KOKAIA Z, LINDVALL O. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci.* 2001; 14:10-18.

BAIMBRIDGE KG. Calcium-binding proteins in the dentate gyrus. *Epilepsy Res Suppl.* 1992; 7:211–220.

- BALU DT & LUCKI I. Adult hippocampal neurogenesis: Regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav.* 2009; 33(3):232-52.
- BENDEL O, BUETERS T, VON EULER M, OVE OGREN S, SANDIN J, VON EULER G. Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005; 25(12):1586-1595.
- BRANDT MD, JESSBERGER S, STEINER B, KRONENBERG G, REUTER K, BICK-SANDER A, BEHRENS W VON DER, KEMPERMANN G. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 24:603–613.
- BOLTON SJ & PERRY VH. Differential blood-brain barrier breakdown and leucocyte recruitment following excitotoxic lesions in juvenile and adult rats. *Exp Neurol.* 1998; 154(1):231-240.
- CAMERON HA & MCKAY RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 2001; 435(4):406-417.
- CAMERON HA, WOOLLEY CS, MCEWEN BS, GOULD E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience.* 1993; 56:337–344.
- CHANG YC, TZENG SF, YU L, HUANG AM, LEE HT, HUANG CC, HO CJ. Early-life fluoxetine exposure reduced functional deficits after hypoxic-ischemia brain injury in rat pups. *Neurobiol Dis.* 2006; 24(1):101-113.
- CHOI YS, CHO KO, KIM SY. Fluoxetine does not affect the ischemia-induced increase of neurogenesis in the adult rat dentate gyrus. *Arch Pharm Res.* 2007; 30(5):641-645.
- CORNFORD EM & OLDENDORF WH. Epilepsy and the blood-brain barrier. *Adv Neurol.* 1986; 44:787-812.
- COUILLARD-DESPRES S, WINNER B, SCHAUBECK S, AIGNER R, VROEMEN M, WEIDNER N, BOGDAHN U, WINKLER J, KUHN HG, AIGNER L. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 2005; 21(1):1-14.
- CUMMINGS JL, TOMIYASU U, READ S, BENSON DF. Amnesia with hippocampal lesions after cardiopulmonary arrest. *Neurology.* 1984; 34:679-81.
- DAYER AG, FORD AA, CLEAVER KM, YASSAEE M, CAMERON HA. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 2003; 460(4):563-572.
- DUDCHENKO PA. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004; 28(7):699-709.
- DUMAN RS, HENINGER GR, NESTLER EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry.* 1997; 54:597-606.

ECKENHOFF MF & RAKIC P. Radial organization of the hippocampal dentate gyrus: a Golgi, ultrastructural, and immunocytochemical analysis in the developing rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 1984; 223:1–21.

ERIKSSON PS, PERFILIEVA E, BJORK-ERIKSSON T, ALBORN AM, NORDBORG C, PETERSON DA, GAGE FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998; 4:1313-1317.

FERNANDES JS, MORI MA, EKUNI R, OLIVEIRA RM, MILANI H. Long-term treatment with fish oil prevents memory impairments but not hippocampal damage in rats subjected to transient, global cerebral ischemia. *Nutr Res.* 2008; 28(11):798-808.

FILIPPOV V, KRONENBERG G, PIVNEVA T, REUTER K, STEINER B, WANG LP, YAMAGUCHI M, KETTENMANN H, KEMPERMANN G. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 23:373–382.

FUKUDA S, KATO F, TOZUKA Y, YAMAGUCHI M, MIYAMOTO Y, HISATSUNE T. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci.* 2003; 23:9357–9366.

GLEESON JG, LIN PT, FLANAGAN LA, WALSH CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron.* 1999; 23(2):257-271.

GOULD E, MCEWEN BS, TANAPAT P, GALEA LA, FUCHS E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 1997; 17:2492-2498.

GOULD E, REEVES AJ, FALLAH M, TANAPAT P, GROSS CG, FUCHS E. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:5263-5267.

GOULD E, TANAPAT P, MCEWEN BS, FLUGGE G, FUCHS E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:3168-3171.

GRAY JA. *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System.* Editor Oxford University Press, Britain. 1982; 53-64.

HARTFUSS E, GALLI R, HEINS N, GOTZ M. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol* 2001; 229:15–30.

HWANG IK, YOO KY, KIM DW, KIM SY, PARK JH, RYOO ZY, KIM J, CHOI SY, WON MH. Ischemia-induced ribosomal protein S3 expressional changes and the neuroprotective effect against experimental cerebral ischemic damage. *J Neurosci Res.* 2008; 86(8):1823-1835.

JIANG W, WAN Q, ZHANG ZJ, WANG WD, HUANG YG, RAO ZR, ZHANG X. Dentate granule cell neurogenesis after seizures induced by pentylentetrazol in rats. *Brain Res.* 2003; 977(2):141-148.

JIN K, SUN Y, XIE L, BATTEUR S, MAO XO, SMELICK C, LOGVINOVA A, GREENBERG DA. Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging Cell.* 2003; 2(3):175-183.

KAWAI T, TAKAGI N, TAKAGI MK, OKUYAMA N, MOCHIZUKI N, TAKEO S. Characterization of BrdU-Positive Neurons Induced by Transient Global Ischemia in Adult Hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004; 24:548–555.

KEE NJ, PRESTON E, WOJTOWICZ JM. Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat. *Exp Brain Res.* 2001; 136:313-320.

KEE N, SIVALINGAM S, BOONSTRA R, WOJTOWICZ JM. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods.* 2002; 115:97-105.

KEITH JR, PRIESTER C, FERGUSON M, SALLING M, HANCOCK A. Persistent increases in the pool of doublecortin-expressing neurons in the hippocampus following spatial navigation training. *Behav Brain Res.* 2008; 188(2):391-397.

KEMPERMANN G, JESSBERGER S, STEINER B, KRONENBERG G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 2004; 27:447–452.

KOKAIA Z & LINDVALL O. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Current Opinion in Neurobiology.* 2003; 13:127–132.

KOMITOVA M, PERFILIEVA E, MATTSSON B, ERIKSSON PS, JOHANSSON BB. Effects of cortical ischemia and postischemic environmental enrichment on hippocampal cell genesis and differentiation in the adult rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002; 22:852-860.

KORNACK DR & RAKIC P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:5768-5773.

KRONENBERG G, REUTER K, STEINER B, BRANDT MD, JESSBERGER S, YAMAGUCHI M, KEMPERMANN G. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol.* 2003; 467:455–463.

KUHN HG, DICKINSON-ANSON H, GAGE FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 1996; 16:2027–2033.

LARSEN MH, HAY-SCHMIDT A, RONN LC, MIKKELSEN JD. Temporal expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA in the rat hippocampus after treatment with selective and mixed monoaminergic antidepressants. *Eur J Pharmacol.* 2008; 578(2-3):114-122.



LEVITT P & RAKIC P. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol* 1980; 193:815–840.

LI WL, CAI HH, WANG B, CHEN L, ZHOU QG, LUO CX, LIU N, DING XS, ZHU DY. Chronic fluoxetine treatment improves ischemia-induced spatial cognitive deficits through increasing hippocampal neurogenesis after stroke. *J Neurosci Res.* 2009; 87(1):112-122.

LICHTENWALNER RJ & PARENT JM. Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006; 26(1):1-20.

LIU J, SOLWAY K, MESSING RO, SHARP FR. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci.* 1998; 18:7768-7778.

LIU PK, GROSSMAN RG, HSU CY, ROBERTSON CS. Ischemic injury and faulty gene transcripts in the brain. *Trends Neurosci.* 2001; 24(10):581-588.

LLORENS-MARTIN M, TORRES-ALEMAN I, TREJO JL. Pronounced individual variation in the response to the stimulatory action of exercise on immature hippocampal neurons. *Hippocampus.* 2006; 16:480–490.

MALBERG JE. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *J Psychiatry Neurosci.* 2004; 29(3):196-205.

MALBERG JE, EISCH AJ, NESTLER EJ, DUMAN RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci.* 2000; 20(24):9104-9110.

MANDYAM CD, HARBURG GC, EISCH AJ. Determination of key aspects of precursor cell proliferation, cell cycle length and kinetics in the adult mouse subgranular zone. *Neuroscience.* 2007; 146(1):108-122.

MANEV H, UZ T, SMALHEISER NR, MANEV R. Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro. *Eur J Pharmacol.* 2001; 411(1-2):67-70.

MCEWEN BS. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 1999; 22:105-122.

MILANI H, UEMURA UU, OLIVEIRA RM, LEPRI ER, XAVIER GF. Loss of CA1 cells following global ischaemia correlates with spatial deficits in the circular platform task. *J Neurosci Methods.* 1998; 80(1):19-27.

MILLER MW & NOWAKOWSKI RS. Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res.* 1988; 457(1):44-52.

MING GL & SONG H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2005; 28:223–250.

MURRAY F, SMITH DW, HUTSON PH. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *Eur J Pharmacol.* 2008; 583(1):115-127.

NAKATOMI H, KURIU T, OKABE S, YAMAMOTO S-ICHI, HATANO O, KAWAHARA N, TAMURA A, KIRINO T, NAKAFUKU M. Regeneration of Hippocampal Pyramidal Neurons after Ischemic Brain Injury by Recruitment of Endogenous Neural Progenitors. *Cell* 2002; 110:429–441.

NOWAKOWSKI RS, LEWIN SB, MILLER MW. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol.* 1989; 18(3):311-318.

PAGANELLI RA, BENETOLLI A, LIMA KC, CESTARI-JUNIOR LA, FAVERO FILHO LA, MILANI H. A novel version of the 8-arm radial maze: effects of cerebral ischemia on learning and memory. *J Neurosci Methods.* 2004; 132:9-18.

PARDRIDGE WM, CONNOR JD, CRAWFORD IL. Permeability changes in the blood-brain barrier: causes and consequences. *CRC Crit Rev Toxicol.* 1975; 3(2):159-199.

PAXINOS G & WATSON C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 4a ed. Editora Academic Press. San Diego, California, USA. 1998.

PECHNICK RN, ZONIS S, WAWROWSKY K, POURMORADY J, CHESNOKOVA V. p21Cip1 restricts neuronal proliferation in the subgranular zone of the dentate gyrus of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105(7):2259-2260.

PENG CH, CHIOU SH, CHEN SJ, CHOU YC, KU HH, CHENG CK, YEN CJ, TSAI TH, CHANG YL, KAO CL. Neuroprotection by Imipramine against lipopolysaccharide-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cells mediated by activation of BDNF and the MAPK pathway. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2008; 18(2):128-140.

PETITO CK, FELDMANN E, PULSINELLI WA, PLUM F. Delayed Hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology.* 1987; 37:1281-1286.

PLÜMPE T, EHNINGER D, STEINER B, KLEMPIN F, JESSBERGER S, BRANDT M, RÖMER B, RODRIGUEZ GR, KRONENBERG G, KEMPERMANN G. Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neurosci.* 2006; 7:77.

POST RM. Transduction of psychological stress into neurobiology of recurrent affective disorder. *American J. Psychiatry.* 1992; 149:999-1010.

PULSINELLI WA & BRIERLEY JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke.* 1979; 10(3):267-272.

RABER J, FAN Y, MATSUMORI Y, LIU Z, WEINSTEIN PR, FIKE JR, LIU J. Irradiation attenuates neurogenesis and exacerbates ischemia-induced deficits. *Ann Neurol*. 2004; 55(3):381-389.

RAKIC P. Neurogenesis in adult primates. *Prog Brain Res*. 2002; 138:3-14.

RAMI A, BREHIER A, THOMASSET M, RABIE A. Cholecalciferol (28-kDa calcium-binding protein) in the rat hippocampus: development in normal animals and in altered thyroid states. An immunocytochemical study. *Dev Biol* 1987; 124:228–238.

RAO MS & SHETTY AK. Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci*. 2004; 19(2):234-246.

SAIRANEN M, LUCAS G, ERNFORS P, CASTRÉN M, CASTRÉN E. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci*. 2005; 25: 1089-1094.

SAIRANEN M, O'LEARY OF, KNUUTTILA JE, CASTRÉN E. Chronic antidepressant treatment selectively increases expression of plasticity-related proteins in the hippocampus and medial prefrontal cortex of the rat. *Neuroscience*. 2007; 144:368-374.

SANTARELLI L, SAXE M, GROSS C, SURGET A, BATTAGLIA F, DULAWA S, WEISSTAUB N, LEE J, DUMAN R, ARANCIO O, BELZUNG C, HEN R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. 2003; 301:805-809.

SAPOLSKY RM. Cortisol concentrations and the social significance of rank instability among wild baboons. *Psychoneuroendocrinology*. 1992; 17:701-709.

SCHARFMAN H, GOODMAN J, MACLEOD A, PHANI S, ANTONELLI C, CROLL S. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol*. 2005; 192(2):348-356.

SCHMIDT W & REYMANN KG. Proliferating cells differentiate into neurons in the hippocampal CA1 region of gerbils after global cerebral ischemia. *Neurosci Lett*. 2002; 334(3):153-156.

SERI B, GARCIA-VERDUGO JM, MCEWEN BS, VAREZ-BUYLLA A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*. 2001; 21:7153–7160.

SHAH PJ, EBMEIER KP, GLABUS MF, GOODWIN GM. Cortical grey matter reductions associated with treatment-resistant chronic unipolar depression. Controlled magnetic resonance imaging study. *Br J Psychiatry*. 1998; 172:527-532.

SHELINE YI, WANG PW, GADO MH, CSERNANSKY JG, VANNIER MW. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:3908-3913.

SHINGO T, SOROKAN ST, SHIMAZAKI T, WEISS S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci*. 2001; 21(24):9733-9743.

SUDO Y, TAKAHARA Y, NAKAJIMA N. Pulsatile cardiopulmonary bypass failed to prevent neuropsychological dysfunction. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 7(2):89-93. Takagi Y, Nozaki K, Takahashi J, Yodoi J, Ishikawa M, Hashimoto N. Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice. *Brain Res*. 1999; 831:283-287.

TAMAKI K, YAMADA K, NAKAMICHI N, TANIURA H, YONEDA Y. Transient suppression of progenitor cell proliferation through NMDA receptors in hippocampal dentate gyrus of mice with traumatic stress experience. *J Neurochem*. 2008; 105(5):1642-1655.

TANAPAT P, GALEA LA, GOULD E. Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci*. 1998; 16(3-4):235-239.

TANAPAT P, HASTINGS NB, RYDEL TA, GALEA LA, GOULD E. Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol*. 2001; 437(4):496-504.

VAN PRAAG H, SCHINDER AF, CHRISTIE BR, TONI N, PALMER TD, GAGE FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 2002; 415:1030–1034.

VON BOHLEN UND HALBACH O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res*. 2007; 329(3):409-420.

WINDLE V & CORBETT D. Fluoxetine and recovery of motor function after focal ischemia in rats. *Brain Res*. 2005; 1044(1):25-32.

WONG ML & LICINIO J. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2, 343-351.

XU Y, KU B, CUI L, LI X, BARISH PA, FOSTER TC, OGLE WO. Curcumin reverses impaired hippocampal neurogenesis and increases serotonin receptor 1A mRNA and brain-derived neurotrophic factor expression in chronically stressed rats. *Brain Res*. 2007; 1162:9-18.

YAGITA Y, KITAGAWA K, OHTSUKI T, TAKASAWA K, MIYATA T, OKANO H, HORI M, MATSUMOTO M. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke* 2001; 32:1890-1896.

ZHANG J, MOATS-STAATS BM, YE P, D'ERCOLE AJ. Expression of insulin-like growth factor system genes during the early postnatal neurogenesis in the mouse hippocampus. *J Neurosci Res*. 2007; 85(8):1618-1627.

ZHAO CS, PUURUNEN K, SCHALLERT T, SIVENIUS J, JOLKKONEN J. Behavioral and histological effects of chronic antipsychotic and antidepressant drug treatment in aged rats with focal ischemic brain injury. *Behav Brain Res*. 2005; 158(2):211-220.

ZOLA-MORGAN S, SQUIRE LR, AMARAL DG. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the Hippocampus. *J Neurosci.* 1986; 6(10):2950-2967.



Running head

**Imipramine, ischemia, memory and neurogenesis**

Title

**Chronic imipramine treatment enhances ischemia-induced hippocampal cell proliferation but fails in recovering spatial memory impairment in rats.**

Angelica P. Schiavon<sup>a</sup>, Humberto Milani<sup>a</sup>, Cássia V. Romanini<sup>a</sup>, Maira L. Foresti<sup>b</sup>,  
Norberto Garcia-Cairasco<sup>b</sup> and Rúbia M. W. de Oliveira<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>Department of Pharmacology, State University of Maringá, Av Colombo 5790, Maringá, Paraná, Brazil, <sup>b</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

\*corresponding author: [mmwoliveira@uem.br](mailto:mmwoliveira@uem.br)

Department of Pharmacology, State University of Maringá  
Av. Colombo 5790, CEP 87020-900  
Maringá, Paraná, Brazil.

Phone: +55- 44-32614814 Fax: + 55-44-32614999.

This work was supported by grants from UEM, FAPESP and CNPq

## **Abstract**

This study was aimed to determine whether imipramine further promotes the neurogenesis induced by transient global cerebral ischemia TGCI in the rat dentate gyrus. The 8-arm aversive radial maze (AvRM) was used to address the effects of imipramine on ischemia-induced memory impairment. Rats were trained in the AvRM and subjected to TGCI. Animals were administered imipramine (20 mg/kg, *i.p.*) or saline during 14 days. 5-bromo-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate (BrdU) was injected 24 h after the last imipramine or saline injection to label proliferating cells. Neurogenesis was evaluated 15 and 31 days after TGCI by DCX-immunohistochemistry. Retention of cognition was assessed weekly on days 16, 23 and 30 post-ischemia. The rate of cell proliferation increases 7 days after TGCI but returns to basal levels after 15 days. Imipramine chronic treatment increased the expression of BrdU and DCX-labeled cells in DG of ischemic rats, although it produced no effect on TGCI-induced memory disruption in the AvRM task. The present study shows that imipramine promotes the neurogenic response to cerebral ischemia, an effect that was not accompanied by recovery of cognitive function. Additional studies are needed to evaluate whether imipramine treatment for longer time than that used presently would be able to improve cognition after TGCI, and its relationship with neurogenesis.

**Keywords:** transitory global cerebral ischemia; imipramine; neurogenesis; hippocampus; aversive radial maze, rats.

## **1. Introduction**



Learning and memory disturbances are major outcomes resulting from transient, global cerebral ischemia (TGCI), which is most frequently caused by reversible cardiac arrest. Depending on the duration of TGCI, humans who survive cardiopulmonary arrest suffer from a combination of cognitive, executive, sensory, and motor impairments (Volpe et al., 1983; Cummings et al., 1984; Zola-Morgan et al., 1986). In some circumstances, patients become severely disabled and have a wide range of memory deficits and executive dysfunction that negatively impact psychosocial and vocational reintegration and impose a great burden on patient's family (Lim et al., 2004; Peskine et al., 2004).

Development of drugs that would limit brain damage after ischemia has been the main focus of recent research. Despite several promising findings obtained in animal models of cerebral ischemia, yet there is no clinically effective strategy available to promote functional recovery from ischemic brain damage (Hussain and Shuaib, 2008). Neuroprotective approaches take into account the inherent capacity of the brain for neuroplasticity and functional repair.

The term neurogenesis is defined as an entire set of events that will result in the addition of a new functional neuron to existing neuronal circuitry (Emsley et al., 2005), which has been identified in many mammal species including man and non-primates (Eriksson et al., 1998; Gould et al., 1999). Neurogenesis appears to continue throughout adulthood in two brain regions, mainly the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricle, and the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus (DG; Schaffer and Gage, 2004). Although the functional significance of hippocampal neurogenesis is not yet well understood, it might be involved in aspects of normal hippocampal function, such as spatial learning and memory (van Praag et al., 2002; Li et al., 2009). Since after ischemia there is an increase in neurogenesis rate in both SVZ and SGZ of DG (Kawai et al., 2004), it is possible that neurogenesis could play a role in both structural and functional recovery from the brain damaged area (Schmidt and Reymann, 2002; Balu and Lucki, 2008).

In rats, both TGCI (Liu et al., 1998; Kee et al., 2001; Yagita et al., 2001) and focal cerebral ischemia (Tasakawa et al., 2002; Zhu et al., 2003; Tureyen et al., 2004) are reported to stimulate neurogenesis in the hippocampal DG. It has also been observed

that granule cell proliferation increases about 6 fold by 7-9 days following ischemia and return to control levels by 2–4 weeks later, and that the majority of surviving cells differentiate into neurons (Kawai et al. 2004). These newly generated neurons can respond to NMDA stimulation, suggesting that they acquire functional features of mature granule neurons (Kawai et al., 2004). Moreover, Nakatomi et al. (2002) have demonstrated that neurogenesis in DG after TGCI leads to regeneration of pyramidal neurons in the CA1 layer of the hippocampus. The authors have interpreted this effect as evidence for the direct migration of neuronal precursors toward the injured areas, possibly to trigger brain repair and contribute to amelioration of the functional deficits. Recent findings support this notion, since the inhibition of hippocampal neurogenesis exacerbates cognitive impairments caused by ischemia (Raber et al., 2004). In contrast, recovery from ischemia-induced spatial memory deficits has been observed after enhancement of hippocampal neurogenesis following exercise (Liu et al., 2007; Luo et al., 2007). However, it is unlikely that ischemia-induced neurogenesis by itself could provide clinically, effective functional recovery, since many of the newly generated cells die by apoptosis within weeks after their generation (Gould et al., 1999; Dayer et al., 2003; Choi et al., 2007), and the number of progenitor cells that will reach the adult stage is low (Takasawa et al., 2002; Sun et al., 2003; Li et al., 2009). Based on these evidences it has been hypothesized that pharmacological interventions that stimulate neurogenesis might have therapeutic value in diseases associated with neuronal loss such as cerebral ischemia.

In this setting, the use of antidepressant drugs seems to be promising, since the neurogenic effect of both imipramine and fluoxetine in the hippocampal DG of adult rodents has been demonstrated (Malberg et al., 2000; Santarelli et al., 2003, Sairanen et al., 2005). This effect appears to be highly dependent on the action of antidepressants in stimulating the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor trkB, as well as other neuronal signaling pathways such as cAMP and CREB (Sairanen et al., 2005; Windle and Corbett, 2005). On this basis, the effects of fluoxetine on the neurogenic and behavioral response after global or focal cerebral ischemia have been investigated. In an early study, fluoxetine (10 mg/kg/day, for 15 days) combined with rehabilitation procedures failed to improve the motor function after regional cerebral

ischemia in rats (Windle and Corbett, 2005). Whether fluoxetine plus rehabilitation promoted neurogenesis was not examined in that study. However, in another study, the neurogenic response to TGCI was found to be unchanged after fluoxetine treatment (5 mg/kg/day) consecutively administered either for 7 days or 20 days (Choi et al., 2007). These negative effects of fluoxetine have been interpreted on the basis of the possibility that the serotonergic system may play a minimal role in BDNF regulation, and that antidepressants with a greater impact on the noradrenergic system may enhance BDNF to a greater extent than fluoxetine (Windle and Corbett, 2005)

In view of these data, firstly we aimed to investigate whether the effect of chronic imipramine treatment could increment the neurogenic effect of TGCI. In a second series of experiment, we evaluated whether chronic imipramine treatment could prevent the amnesic effect of TGCI, as measured in a novel version of the eight-arm radial maze.

## **2. Material and Methods**

### **2.1 Animals**

Male Wistar rats (3–4 months of age, 270–300 g body weight) were acquired from the local *vivarium* of the State University of Maringá. The rats were housed in controlled temperature room ( $22 \pm 1$  °C) on 12 h alternating light/dark cycle (lights on at 0700 h). Food and water were provided *ad libitum* throughout the experiments. The experimental procedures performed adhere to the ethical principles set down by the

Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the State University of Maringá (CEEA 066/2005), Paraná, Brazil.

## **2.2 Ischemia**

Transient, global cerebral ischemia (TCGI) was induced by using the 4-vessel occlusion (4VO) technique with modifications (Fernandes et al., 2008). Briefly, the animal were anesthetized with halothane (Tanohalo<sup>®</sup>, Cristália, Itapira-SP, Brazil) and fixed in a stereotaxic frame for bilateral electrocoagulation of the vertebral arteries at the level of the first cervical vertebra. To avoid the risk of defective occlusion, the vertebral arteries were firstly severed using the tip of an unipolar electrode which was inserted and gently rotated within the alar foramen until bleeding was produced being immediately stanching by electrocoagulation. Afterward, an incision into the ventral neck exposed the common carotid arteries, which were loosely snared with a silk thread. Five to 6 h later, the thread was carefully tightened for 15 min. Loss of the righting reflex within 2 min of carotid occlusion, unresponsiveness to gentle touch, mydriasis, and tonic extension of the paws were considered indicative of effective ischemia. Rectal temperature was monitored with a digital thermometer (Minipa, APPA MT-520, São Paulo, SP, Brazil). During surgery, core temperature was kept around 37.5 °C by a heating blanket. Throughout occlusion and during the first hour of reperfusion, the rats were maintained in a warming box at 30 °C (Seif el Nasr et al., 1992) and rectal temperature was monitored up to 3.5 h after reperfusion. Sham-operated animals were subjected to the same surgical intervention, except that the vertebral and carotid arteries were left intact.

## **2.3 Immunohistochemistry**

At the end of each experimental protocol (see Figure 1 for experimental design), brains were removed and post fixed over 2 h in paraformaldehyde (4%) and stored for at least 48 h in 30% sucrose for cryoprotection. Coronal sections (40 µm) were obtained in a cryostat (Criocut 1800, Reichert-Jung, Heidelberg, Germany) and processed for 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) or doublecortin (DCX) immunohistochemistry. For BrdU

immunohistochemistry, free-floating sections were digested in trypsin 0.005% for 5 min at 37°C followed by incubation in glycine 0.1M for 5 min. They were then incubated in 1N HCl for 75 min at 40°C for DNA denaturation, and neutralized with 0.1M borate buffer (pH 8.5). After several washings in PBS (0.1M, pH 7.4), sections were treated in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 min) and then blocked with 2% bovine serum albumin in PBS for 60 min. Sections were incubated with a mouse monoclonal antibody anti-BrdU (1:100, Santa Cruz Biotechnology) in PBS containing 0.3% Triton X-100 for 48 h at room temperature. After several rinses in PBS, sections were then incubated with a biotinylated goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology) for 2 hours at room temperature. They were washed with PBS and further incubated in ABC solution (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 2 hours. The peroxidase reaction was carried out by incubating the sections with 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma) at 0.25 mg/ml and 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

For DCX immunohistochemistry, the sections were quenched by incubation with 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 min) and non-specific antibody binding was blocked with 4% bovine serum albumin 2% in PBS 0.1M for 60 min. The sections were washed in PBS and placed overnight in a PBS solution containing 0.3% Triton X-100 and a goat polyclonal anti-DCX antibody (1:200, Santa Cruz Biotechnology). Sections were washed in PBS 0.1M before incubation with a biotin conjugated rabbit anti-goat secondary antibody (1:500, Santa Cruz Biotechnology) for 2 h. Sections were again washed in PBS 0.1 M, incubated with ABC Kit and stained with DAB, as described above.

Following immunohistochemistry assays, sections were mounted onto subbed slides (4% gelatin, 0.25% chromalum), dehydrated with an ascending series of ethanol, cleared in xylene and coverslipped using Permount® (Fisher Scientific, USA).

## **2.4 Cell counting**

Slides containing the sections were randomized and coded prior the quantitative analysis. BrdU and DCX-positive cells in the dentate gyrus were counted under 40X objective (Olympus Optical, BX50) in both hemispheres.

For BrdU, 6-8 sections that were spaced 200 µm apart and corresponded to coronal coordinates from Bregma -2.80 to -4.52 mm (Paxinos & Watson, 1997) were

counted. Each microscope image was digitized and the area of the dentate gyrus, including the hilus, SGZ, and inner third of the granular cell layer, was measured on each section using a computer-based imaging device system (AxioVision 4.0, USA). The density of BrdU-positive cells in each section was calculated by dividing the number of BrdU-positive nuclei by the area of the dentate gyrus (Liu et al., 1998). Section densities were averaged to obtain a mean density value for each animal.

All DCX-positive cells in the DG were counted in 2-3 brain sections corresponding to coronal coordinates from Bregma  $-2.80$  to  $-4.52$  mm according to Paxinos and Watson atlas (1987).

## **2.5 Behavioral Procedures**

### **2.5.1 Aversive, eight-arm radial maze (AvRM)**

Memory acquisition performance was assessed in a novel version of the 8-arm radial maze referred as aversive radial maze (AvRM). Differently from the conventional, “appetitive” radial maze paradigm, the AvRM model uses the rat’s natural behavior of avoiding open and illuminated areas and its preference for darkened and enclosed shelter (Barnes, 1979). A schematic illustration and a detailed description of the confined version of the AvRM model are provided elsewhere (Fernandes et al., 2008). Briefly, eight arms radiate outward from alternate sides of a central polygonal platform. At the end of each arm, an opening of 9 cm in diameter provides access to a darkened wooden box located below any opening, which serves as a refuge for the rat (the goal box). Of the 8 arms, however, only one contains the true refuge, that is, a closed-end box, which can be shifted from one arm to another between trials. In the remaining 7 arms, the boxes are open-end, that is, they have walls like the true goal box but lack the bottom. Transparent acrylic rails, 2.5-cm high, border each arm to prevent the animal from falling. The central arena is separated from the arms by transparent acrylic guillotine doors. This rotatable maze is elevated 90 cm above the floor on a metal stand. From a separate room, a pulley system connected to each individual guillotine door allows the experimenter to confine the animal in the central arena before release to explore the arms. Several extramaze cues (posters on the walls, a closed door, and removable 3-dimensional objects) were available in the room. A small ventilator located on the floor generated constant noise in the testing room throughout the experiment. Two fluorescent lamps of 56 W each were fixed 80 cm above the maze. The video camera was positioned 220 cm away from, and 130 cm above the maze. For descriptive data analysis the 8 arms were numbered according to their location in relation to the extramaze cues such that the sequence and frequency of visits to each different location could be recorded.

### **2.5.2 Preoperative Acquisition Trial (Phase 1)**

Before training, naive, intact animals were habituated to the testing apparatus. The guillotine-doors were open and the rats were placed individually and directly in the center of the maze being allowed to explore until finding the goal box, or until a 4-min period had elapsed. If the goal box was not found within 4 min, the rat was placed into the arm containing the correct goal box and gently forced to enter it by the experimenter. The rat remained in the goal box for 4 min, after which it was returned to its home cage. During habituation, the extra-maze cues were removed from the testing room, except for the video camera, and the spatial position of the goal box was randomly changed between subjects. This habituation procedure was repeated for 3 days, consecutively. On the 4<sup>th</sup> day, the extra-maze cues were replaced, and acquisition training was started. The rats were trained using three trials/sessions, one session per day, for 12 days. At the beginning of each training session, the rat was placed into the center of the arena for 30 seconds, now with all arms being closed and the video camera turned on. The arms were then opened simultaneously, and the animal was allowed to explore the entire maze. When the rat entered half way down a non-rewarded arm (containing a false goal box), the guillotine doors of the remaining arms were lowered simultaneously. On the rat's return to the central area, the newly-visited arm was closed immediately, and the animal was again confined in the arena, now for a further 10-second period. When the rat found and entered half way down the rewarded arm (containing the true goal box), the guillotine door of that arm was lowered, forcing the animal to enter the correct goal box, where it was left for 1 min. If the rat did not find the correct arm within 4 min, it was placed into it and gently introduced into the shelter. When the rat inserted only its head into an incorrect opening and remained there for more than 1 min, it was replaced at the center of the maze and the trial re-started. Between trials, the maze was cleaned from excrements and then randomly rotated on its central axis; the goal box was randomly moved to any of the other seven arms, although its spatial position in relation to the extra-maze cues was kept unchanged across trials and sessions, and was the same for all rats. Behavioral performance was measured by 'latency' to find the goal box, the 'number of reference memory errors', and the 'number of working memory errors'. Within a given trial, a reference error was counted when the rat visited an arm containing a false goal box for the first time.



However, if the rat returned to an arm which had been visited previously during that trial, a working memory error was registered. An arm was considered visited when the rat entered halfway down its length. The animal was considered to have left an arm when it placed all four paws on the central platform. A trial was terminated after the rat entered halfway down the correct arm, independently of it entered or not the shelter.

### **2.5.3 Postoperative Retention Trial (Phase 2)**

On the last day of preoperative training (day 12), the rats were assigned to the following groups (n=7-10): sham + saline, sham + imipramine, ischemia + saline, and ischemia + imipramine. Group assignment was done in a balanced way on the basis of individual acquisition performance calculated as the mean latency observed on the last three days of preoperative training (days 10 – 12). Animals with a mean latency  $\geq 100$  sec were excluded. The performance for retention of cognition (*i.e.*, memory), which was acquired (*i.e.*, learned) during the preoperative training, began 17 days after TGCI and continued for 3 weeks, at a rate of one retention trial (RT) per week (*i.e.*, on days 30, 37 and 44). Before RTs, rats received imipramine (20 mg/kg, *i.p.*) for 14 days consecutively, followed by BrdU (200 mg/kg) on the day before the first RT (see Figure 1). The procedures for postoperative RTs were the same as the procedures described above for preoperative acquisition training, with the exception of the habituation phase.

## **2.6 Experimental Design**

Three experiments were planned as described below:

Experiment I: Effect of TGCI on the cell proliferation in the DG of the hippocampus was evaluated. Accordingly to Kawai et al. (2004) ischemia produces a maximum increase in dentate gyrus neurogenesis at 5-9 days after ischemia, reaching a peak on day 7 post-ischemia; after this period neurogenesis decays to the levels observed in control animals. Figure 1 shows a scheme of the experimental protocol.

Rats (n=5-7) were subjected to TGCI and then injected with saline for 7 or 14 days consecutively. Twenty-four hours after the last saline administration, the thymidine analog BrdU (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) was administered by *i.p.* route at 200 mg/Kg, divided into four injections 2 h apart. Twenty-four hours after the BrdU administration, rats were deeply anesthetized and perfused transcardially with saline followed by 4% paraformaldehyde in PBS 0.1 M (pH 7.4, 20 mL/min for 10 minutes) and the brains were carefully removed for immunohistochemical detection of BrdU-labelled cells.

Experiment II: Effect of imipramine on ischemia-induced cell proliferation and neurogenesis was evaluated. Figure 1 shows a scheme of the experimental protocol. On the day after ischemia, imipramine (Sigma-Aldrich, St. Louis-MO, U.S.A.) began to be administered at once a day (20 mg/kg, *i.p.*), for 14 days. On day 15, BrdU was administered as done in Experiment I. Ischemic control rats and sham-operated rats were given an equivalent volume of saline. In addition to BrdU-labeling, immunohistochemistry for DCX was also used in this experiment aiming to evaluate the expression of immature neuroblasts in the DG of the hippocampus.

Experiment III: In this experiment we evaluated whether the effect observed with imipramine on ischemia-induced neurogenesis could modify the cognitive (memory) deficit caused by ischemia. After habituation, rats were trained for acquisition of the spatial task for 12 consecutive days before being subjected to TGCI (on day 13). Imipramine (20 mg/kg, *i.p.*) began to be administered one day after ischemia and continued for 14 days consecutively (days 14 to 28), followed by BrdU injection (day 29). The postoperative retention trails were carried out on days 30, 37 and 45 (*i.e.*, at 16, 23 and 30 days *post-ischemia*), following which the animals were sacrificed and the brains were prepared for immunohistochemistry for BrdU- and DCX-labelling cells.

## **2.7 Statistical analysis**

One-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's test was used to analyze the effect of imipramine on ischemia-induced hippocampal cell proliferation and neurogenesis. Data are presented as means  $\pm$  standard error of the means.

For behavioral data analysis, logarithmic transformation of the data was used to homogenize variance within sessions and trials. Because of this, non-parametric statistical tests were used when appropriate (see below). The data for *latency* and *number of errors* collected during the first 9 days of preoperative training were not used for statistical analysis and are not presented graphically. Instead, the data obtained during the last 3 days of preoperative training (*i.e.*, days 10-12) were averaged and used as baseline, asymptotic performance. Post-ischemia retention performance measured across the various retention trials RT daily analysis of data) was analyzed using a two-way, repeated-measures ANOVA, with *Group* as the between-subjects factor and *Trials* as the within-subjects factor (Statistica 6.0). The Bonferroni Multiple Range Test was used to distinguish between groups (treatments) following significant main effects of *Group*. The Kruskal-Wallis analysis of variance, followed by Dunn's multiple range test when appropriate, was used to compare the *mean total latency* and *mean total number of errors* among groups (calculated across the last 3 days of pre-ischemia training, or post-ischemia RT on days 30, 37 and 44). Afterward, the Wilcoxon Matched Sample Test was used for within-group comparisons of pre- and post-ischemia performance (days 10-12 vs. day 30). Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1 *Experiment I: Increased cell proliferation in the DG after TGCI*

After 7 or 14 days of TGCI, proliferating cells with BrdU-positive nuclei were observed predominately in the deepest layers of the SGZ and hilus of DG. The nuclei were darkly and uniformly stained, varied in shape and frequently appeared in clusters (Figure 2). One-way ANOVA followed by Tukey's test revealed a significant increase in the density of BrdU-positive cells in the DG 7 days after ischemia ( $443.6 \pm 85.3$  cells/mm<sup>2</sup>) as compared to sham-operated group ( $138.5 \pm 19.5$  cells/mm<sup>2</sup>;  $F_{2,18}=20.5$ ,  $P < 0.0001$ ). In the group examined 14 days after ischemia, the density of BrdU-positive cells in the DG was similar to that found in the sham group ( $72.7 \pm 9.6$  cells/mm<sup>2</sup>).

### **3.2 Experiment II: Chronic imipramine treatment increases cell proliferation in the DG after TGCI.**

As shown in Figure 3A, overall ANOVA detected a significant effect of chronic imipramine treatment following TGCI on BrdU expression in the DG of rats ( $F_{3,27}=10.07$ ,  $P = 0.0002$ ). A significant increase in the density of BrdU-positive nuclei was observed in ischemia + imipramine group ( $213.80 \pm 26.55$ ,  $P < 0.05$ ) when compared to sham + saline ( $138.50 \pm 19.49$ ) and sham + imipramine ( $110.10 \pm 15.61$ ) groups. In addition, a significant reduction on the density of BrdU-positive nuclei was detected in ischemia + saline group ( $70.56 \pm 15.33$ ) when compared to ischemia + imipramine group ( $P < 0.001$ , Tukey's test). There was no difference between sham + saline and sham + imipramine groups ( $P > 0.05$ , Tukey's test).

The expression of DCX-positive cells in DG 14 or 31 days after ischemia was used to evaluate the effect of chronic imipramine on neurogenesis. As shown in Figure 3 (G-J), immunohistochemical staining revealed the presence of DCX-positive neurons in the granule cell layer and SGZ of the hippocampal DG of control and ischemic animals. ANOVA showed a significant increase of the number DCX-positive cells 14 days after TGCI in ischemia + saline ( $353.20 \pm 22.32$ ) and ischemia + imipramine ( $295.80 \pm 55.88$ ) groups when compared to sham + saline ( $92.62 \pm 7.20$ ) and sham + imipramine groups ( $73.42 \pm 35.34$ ;  $F_{3,18}=15.03$ ,  $P < 0.0001$ ) (Figure 3F). No significant difference was observed in the number of DCX-positive cells 30 days after TGCI ( $F_{3,19}=2.73$ ,  $P = 0.08$ ) sham + saline =  $87.6 \pm 6.3$ ; sham + imipramine =  $69.8 \pm 7.4$ , ischemia + saline =  $73.6 \pm 10.6$ ; ischemia + imipramine =  $53.5 \pm 8.9$ )

### **3.3 Experiment III: Effect of chronic imipramine treatment on TGCI-induced memory impairment and hippocampal neurogenesis.**

Figure 4 (upper panels) shows the temporal distribution of ischemia-induced retention deficit (amnesia) and the effect of imipramine thereon. Two-way, repeated-measures ANOVA of *Group* retention performance assessed at 16, 23 and 30 days after ischemia, revealed a highly significant main effect for all the three parameters studied, i.e., 'latency' ( $F_{2,74} = 8.92$ ,  $P = 0.00069$ ), 'number of reference memory errors' ( $F_{2,74} = 6.09$ ,  $P = 0.0052$ ) and 'number of working memory errors' ( $F_{2,74} = 3.66$ ,  $P =$

0.035). No main effect of *Session* ( $F_{2,74} = 0.033$  to  $2.07$ ,  $P > 0.05$ ) and no *Group*  $\times$  *Session* interaction ( $F_{4,74} = 0.95$  to  $2.17$ ,  $P > 0.05$ ) were observed. Bonferroni's *post hoc* test revealed that ischemia significantly disrupted retention performance in the vehicle-treated group, as measured by the parameters 'latency' and 'working memory errors' (upper panels:  $*P = 0.0012$  to  $0.016$ , ischemia + saline group vs. sham + saline group). Ischemia also increased the daily number of 'reference memory errors', but this effect was marginally above of the 5% significance level ( $P = 0.058$ , ischemia + saline group vs. sham + saline group). This amnesic effect of ischemia seems more consistent when considering 'mean total latency' and 'mean total number of errors' calculated across the three retention trials (Figure 4, lower panels). By this analysis, the Kruskal-Wallis ANOVA of *Group* retention performance also revealed a highly significant effect for all three parameters (Main effect of *Group*: K-W =  $7.16$  to  $12.18$ ,  $P = 0.028$  to  $0.0016$ ). Dunn's *post hoc* test revealed retention impairment in the group subjected to ischemia and treated with saline (lower panels:  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ , ischemia + saline group vs. sham + saline group). This amnesic effect of ischemia was not changed by treatment with the antidepressant imipramine measured either daily (upper panels:  $\#P = 0.0041$  to  $0.016$ , ischemia + imipramine group vs. sham + saline group;  $P > 0.05$ , ischemia + imipramine group vs. ischemia + saline group) or cumulatively (lower panels:  $\#P < 0.05$ , ischemia + imipramine group vs. sham + saline group;  $P > 0.05$ , ischemia + imipramine group vs. ischemia + saline group).

In an additional analysis of the retention data, the mean cumulative performances measured during pre-ischemia (training phase) was compared to those observed post-ischemia (retention phase). All parameters increased significantly from the pre- to post-ischemic phases in the ischemia + saline-treated group (lower panels:  $\$P < 0.011$  to  $0.038$ ), indicating the retrograde amnesic effect of ischemia. Also by this analysis, the amnesic effect of ischemia was not changed by imipramine ( $P > 0.05$ , ischemia + imipramine group vs. ischemia + saline group;  $^+P < 0.05$ , ischemia + imipramine post- vs ischemia + imipramine pre-).

#### 4. Discussion

Cell proliferation and neurogenesis in the DG of adult animals have been shown to be dynamically regulated. In this study we addressed whether imipramine chronic treatment contributes to enhanced neurogenesis in the DG and to functional recovery following TGCI in rats. The rate of cell proliferation measured by BrdU-labeling increases 7 days after ischemia but returns to basal levels after 15 days. Concomitantly, immunohistochemistry for DCX, an endogenous protein marker specific for immature neurons, detected an increased number of new neurons in the DG 15 days after ischemia. However, there were no changes in DCX-positive cells 30 days after ischemia even after imipramine treatment. Although imipramine chronic treatment for 14 days increased the expression of BrdU and DCX-labeled cells in DG of ischemic rats it produced no effect on ischemia-induced memory disruption in the AvRM task.

Our data are in agreement with others who observed that TGCI stimulates cell proliferation in DG, which peaks at 7 to 10 days after ischemia and returns to baseline levels within 2 to 4 weeks (Liu et al., 1998; Yagita et al., 2001; Kawai et al., 2004). As BrdU is an indicator of DNA synthesis, its incorporation into newly synthesized DNA can occur not only during the S-phase of the cell cycle preceding cell division, but also during the repair of damaged DNA (Rakic, 2002). Considering that brain ischemia leads to elevated DNA damage (Liu et al., 2001) it is possible that BrdU could be taken up by different cells (*e.g.* glial cells) during the repair of ischemic damage. However, after 7 days of TGCI, cells with BrdU-positive nuclei were observed mostly in SGZ and hilus of DG, typical location of progenitor cells, suggesting that BrdU incorporation occurred during proliferation of progenitor cells rather than as a result of a damage DNA repair process (Cameron and McKay, 2001).

The return of BrdU-positive cells density to the control level after 14 days of ischemia is expected since ischemia-induced cell proliferation is a transient phenomenon (Lichtenwalner and Parent, 2006). Indeed, many newly generated cells die in several weeks after ischemia, but the majority of cells that survive will differentiate into neurons (Liu et al., 1998; Kawai et al., 2004). Consistent with these data, we observed an increased expression of DCX-positive cells in the DG after 14 days of ischemia, supporting the neuronal nature of these cells. Although the role of hippocampal neurogenesis is not completely understood, it was demonstrated that after

ischemic injury newborn neurons migrate to injured brain regions (Schmidt and Reymann, 2002; Zhang et al., 2007) where they can form appropriated synapses with the existing neurons and may contribute to recovery of hippocampal-dependent functions that were lost after ischemia (Li et al., 2009; Nakatomi et al., 2002; Bendel et al., 2005). Raber et al. (2004) have demonstrated that radiation-induced ablation of neuronal precursor cells in the adult rodent brain worsens outcome from cerebral ischemia suggesting that the progeny of these cells may be functional.

Several studies have demonstrated that chronic imipramine treatment promotes cell proliferation and differentiation in the DG of adult rats under physiological or experimental conditions (Manev et al., 2001; Sairanen et al., 2005; Xu et al., 2007; Tamaki et al., 2008; Pechnick et al., 2008). In the present study, however, chronic imipramine treatment did not have a significant effect on cellular proliferation in sham-operated animals, despite the treatment regimen used here was similar to those described for others (Murray et al., 2008; Tamaki et al., 2008). The treatment with fluoxetine for 3 weeks and examined 28 days after BrdU injection (75 mg/kg, on day 7 after starting fluoxetine) also failed to promote cell proliferation (Choi et al., 2007). However, fluoxetine treatment for 1 week increases neurogenesis after hypoxia/ischemia (Chang et al., 2006), a finding similar to that observed with imipramine in the present study (Figure 2). One possible explanation for the failure of imipramine to stimulate cell proliferation in sham-operated rats may concern with the protocol for BrdU administration, although similar procedure was used with fluoxetine in the Choi's study (2007). BrdU is available for DNA incorporation for only about 15 min after systemic injection (Mandyam et al., 2007) and subsequent cells divisions lead to a dilution of the nuclear BrdU content (Coulliard-Despres et al., 2005). Therefore, under BrdU protocol used in the present work, it may that BrdU reached the brain in an insufficient concentration. Accordingly, since TGCI can alter the permeability of the blood brain barrier, BrdU would more available to the brain after ischemia, thus providing a more efficiently cell labeling.

The mechanisms underlying the effect of imipramine in cell proliferation after ischemia are not understood. Recent studies provide evidence that imipramine chronic treatment (10 mg/Kg, 14 days) increases BDNF and synaptophysin mRNA expression

in the hippocampus of rats, indicating this antidepressant treatment induces neuronal and synaptic reorganization (Larsen et al., 2008). Accordingly, chronic imipramine treatment (15 mg/Kg, 21 days) increases the expression of two plasticity-associated proteins, the polysialylated form of nerve cell adhesion molecule (PSA-NCAM) and growth-associated protein 43 (GAP-43), suggesting that this antidepressant is involved in synaptic plasticity and connectivity in the hippocampus (Sairanen et al., 2007). The effects of imipramine on neuroplasticity are very likely to contribute to increased cell proliferation after ischemia, although other factors, such as neuroprotective action, may be also involved (Hwang et al., 2008; Peng et al., 2008).

DCX is a microtubule-associated protein that is transiently expressed in virtually all migrating neuronal precursors of the developing central nervous system (Coulluard-Despres, 2005). In the adult brain, DCX-expression is retained within areas of continuing neurogenesis, such as the SGZ of the hippocampus. DCX expression starts as neuroblasts are generated, peaks during the second week, and is down-regulated concomitantly with the appearance of mature neuronal markers (von Bohlen and Halbach, 2007). On average, the late phase of DCX-expression appears to last approximately 3 weeks when DCX-expression becomes absent in mature cells (Plümpe et al., 2006). In agreement, the number of DCX-positive cells was enhanced 14 days and declined to control levels after 30 days of ischemia. We interpreted this effect as a result of the dynamics of DCX-expression on different stages of neuronal maturation.

As discussed above, imipramine treatment for 14 days stimulated neurogenesis measured 15 days after TGCI, a time-point in which the neurogenic response to TGCI is not different from controls (Kawai et al., 2004; present results, Figure 1). This may be an indication that imipramine promoted the survival of newborn cells proliferation induced early by TGCI. However, whether such an effect could be sustained up to the end of behavioral testing (30 days after TGCI) can not be known from the present study. In that experiment, we were surprised by the complete absence of any BrdU-positive cells in the brains of all animals used in the behavioral experiment. We have no explanation for such result, but some unidentified technical problem may have occurred that hampered the expression of the BrdU labeling. Therefore, we can not conclude whether the negative effect of imipramine on cognition were due to lack of neurogenesis 30 days



after TGCI. It may be possible, however, that imipramine administration for 14 days could not be sufficient to promote a long lasting neurogenic response with consequent behavioral recovery. This is supported by the results of a few studies using the antidepressant fluoxetine. The failure of imipramine to counteract the amnesic effect of TGCI agrees with previous findings reporting that fluoxetine also failed to improve the sensorimotor deficits caused by focal, cerebral ischemia (Windle and Corbett, 2005). Similar to our study, in the Windle's study the pharmacological treatment was given for 14 days post-training. Similarly, fluoxetine administered for 14 days after stroke also failed to prevent stroke-induced both cognitive and sensorimotor deficits (Li et al., 2009). However, when fluoxetine was given for 28 days post-ischemia, the stroke-induced learning and memory impairment was reduced, and the rate of survival of newly generated neurons was increased (Li et al., 2009). In addition, the pharmacological blockade of neurogenesis annulated the beneficial effect of fluoxetine on behavior, indicating that fluoxetine-induced neurogenesis contributed to the behavioral recovery (Li et al., 2009). Taken together, these data suggested that the duration of treatment with antidepressant drugs may be crucial for neurogenesis-based functional recovery after ischemic brain injury. If the neurogenic profile of imipramine would be similar to that of fluoxetine, then it is possible that 14 days of imipramine administration was insufficient to promote an adequate survival rate of the newborn cells and, consequently, the effect of imipramine on cognition could not be expressed.

In conclusion, the present study shows that imipramine can enhance cell proliferation in response to TGCI, an effect that was not accompanied by recovery of cognitive function. Additional studies are needed to evaluate whether imipramine treatment for longer time than that used presently would be able to improve both acquisition (learning) and retention (memory) performance after TGCI, and its relationship with neurogenesis. It would also be interesting to compare the effects of both imipramine and fluoxetine using the same animal model of cerebral ischemia and behavioral tasks.

## Acknowledgements

We thank Marcos Alberto Trombelli for technical support.

## References

- Balu DT, Lucki I (2009). Adult hippocampal neurogenesis: Regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav* **33**: 232-52.
- Barnes CA (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* **93**: 74-104.
- Bendel O, Bueters T, von Euler M, Ove Ogren S, Sandin J, von Euler G (2005). Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**: 1586-95.
- Cameron HA, McKay RD (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* **435**: 406-17.
- Chang YC, Tzeng SF, Yu L, Huang AM, Lee HT, Huang CC, Ho CJ (2006). Early-life fluoxetine exposure reduced functional deficits after hypoxic-ischemia brain injury in rat pups. *Neurobiol Dis* **24**: 101-13.
- Choi YS, Cho KO, Kim SY (2007). Fluoxetine does not affect the ischemia-induced increase of neurogenesis in the adult rat dentate gyrus. *Arch Pharm Res* **30**: 641-45.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L (2005). Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* **21**: 1-14.
- Cummings JL, Tomiyasu U, Read S, Benson DF (1984). Amnesia with hippocampal lesions after cardiopulmonary arrest. *Neurology* **34**: 679-81.
- Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA (2003). Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* **460**: 563-72.
- Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD (2005). Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol* **75**: 321-41.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* **4**: 1313-17.

Fernandes JS, Mori MA, Ekuni R, Oliveira RM, Milani H (2008). Long-term treatment with fish oil prevents memory impairments but not hippocampal damage in rats subjected to transient, global cerebral ischemia. *Nutr Res* **28**: 798-808.

Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E (1999). Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 5263-67.

Hwang J, Zheng LT, Ock J, Lee MG, Kim SH, Lee HW, Lee WH, Park HC, Suk K (2008). Inhibition of glial inflammatory activation and neurotoxicity by tricyclic antidepressants. *Neuropharmacology* **55**: 826-34.

Hussain MS, Shuaib A (2008). Research into neuroprotection must continue... But with a different approach. *Stroke* **39**: 521-2.

Kawai T, Takagi N, Miyake-Takagi K, Okuyama N, Mochizuki N, Takeo S (2004). Characterization of BrdU-positive neurons induced by transient global ischemia in adult hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* **24**: 548-55.

Kee NJ, Preston E, Wojtowicz JM (2001). Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat. *Exp Brain Res* **136**: 313-20.

Larsen MH, Hay-Schmidt A, Ronn LC, Mikkelsen JD (2008). Temporal expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA in the rat hippocampus after treatment with selective and mixed monoaminergic antidepressants. *Eur J Pharmacol* **578**: 114-22.

Li WL, Cai HH, Wang B, Chen L, Zhou QG, Luo CX, Liu N, Ding XS, Zhu DY (2009). Chronic fluoxetine treatment improves ischemia-induced spatial cognitive deficits through increasing hippocampal neurogenesis after stroke. *J Neurosci Res* **87**: 112-22.

Lichtenwalner RJ, Parent JM (2006). Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**: 1-20.

Lim C, Alexander MP, LaFleche G, Schnyer DM, Verfaellie M (2004). The neurological and cognitive sequelae of cardiac arrest. *Neurology*, **63**: 1774-8.

Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR (1998). Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* **18**: 7768-78.

Liu PK, Grossman RG, Hsu CY, Robertson CS (2001). Ischemic injury and faulty gene transcripts in the brain. *Trends Neurosci* **24**: 581-88.

Liu Z, Fan Y, Won SJ, Neumann M, Hu D, Zhou L, Weinstein PR, Liu J (2007). Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia. *Stroke* **38**: 146-52.

Luo CX, Jiang J, Zhou QG, Zhu XJ, Wang W, Zhang ZJ, Han X, Zhu DY (2007). Voluntary exercise-induced neurogenesis in the postischemic dentate gyrus is associated with spatial memory recovery from stroke. *J Neurosci Res* **85**: 1637-46.

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* **20**: 9104-10.

Malberg JE (2004). Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *J Psychiatry Neurosci* **29**: 196-205.

Mandyam CD, Harburg GC, Eisch AJ (2007). Determination of key aspects of precursor cell proliferation, cell cycle length and kinetics in the adult mouse subgranular zone. *Neuroscience* **146**: 108-22.

Manev H, Uz T, Smalheiser NR, Manev R (2001). Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro. *Eur J Pharmacol* **411**: 67-70.

Murray F, Smith DW, Hutson PH (2008). Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *Eur J Pharmacol* **31**: 115-27.

Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M (2002). Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* **110**: 429-41.

Peng CH, Chiou SH, Chen SJ, Chou YC, Ku HH, Cheng CK, Yen CJ, Tsai TH, Chang YL, Kao CL (2008). Neuroprotection by Imipramine against lipopolysaccharide-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cells mediated by activation of BDNF and the MAPK pathway. *Eur Neuropsychopharmacol* **18**: 128-40.

Paxinos G, Watson C, editors (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3a ed. Editora Academic Press. San Diego, California, USA..

Pechnick RN, Zonis S, Wawrowsky K, Pourmorady J, Chesnokova V (2008). p21Cip1 restricts neuronal proliferation in the subgranular zone of the dentate gyrus of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 2259-60.

Pesquine A, Picq C, Pradat-Diehl P (2004). Cerebral anoxia and disability. *Brain Inj* **18**: 1243-54.

Plümpe T, Ehninger D, Steiner B, Klempin F, Jessberger S, Brandt M, Römer B, Rodriguez GR, Kronenberg G, Kempermann G (2006). Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neurosci* **7**:77.

Raber J, Fan Y, Matsumori Y, Liu Z, Weinstein PR, Fike JR, Liu J (2004). Irradiation attenuates neurogenesis and exacerbates ischemia-induced deficits. *Ann Neurol* **55**: 381-9.

Rakic P (2002). Neurogenesis in adult primates. *Prog Brain Res* **138**:3-14.

Rola R, Mizumatsu S, Otsuka S, Morhardt DR, Noble-Haeusslein LJ, Fishman K, Potts MB, Fike JR (2006). Alterations in hippocampal neurogenesis following traumatic brain injury in mice. *Exp Neurol* **202**: 189-99.

Sairanen M, Lucas G, Erfors P, Castrén M, Castrén E (2005). Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* **25**: 1089-94.

Sairanen M, O'Leary OF, Knuutila JE, Castrén E (2007). Chronic antidepressant treatment selectively increases expression of plasticity-related proteins in the hippocampus and medial prefrontal cortex of the rat. *Neuroscience* **144**: 368-374.

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* **301**: 805-809.

Schaffer DV, Gage FH (2004). Neurogenesis and neuroadaptation. *Neuromolecular Med* **5**:1-9.

Schmidt W, Reymann KG (2002). Proliferating cells differentiate into neurons in the hippocampal CA1 region of gerbils after global cerebral ischemia. *Neurosci Lett* **334**: 153-6.

Seif el Nasr M, Nuglisch J, Krieglstein J (1992). Prevention of ischemia-induced cerebral hypothermia by controlling the environmental temperature. *J Pharmacol Toxicol Methods* **27**:23-6.

Sun YE, Martinowich K, Ge W (2003). Making and repairing the mammalian brain--signaling toward neurogenesis and gliogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **14**: 161-8.

Tamaki K, Yamada K, Nakamichi N, Taniura H, Yoneda Y (2008). Transient suppression of progenitor cell proliferation through NMDA receptors in hippocampal dentate gyrus of mice with traumatic stress experience. *J Neurochem* **105**: 1642-55.

Takasawa K, Kitagawa K, Yagita Y, Sasaki T, Tanaka S, Matsushita K, Ohstuki T, Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M (2002). Increased proliferation of neural progenitor cells but reduced survival of newborn cells in the contralateral hippocampus after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**: 299-307.

Türeyen K, Vemuganti R, Sailor KA, Bowen KK, Dempsey RJ (2004). Transient focal cerebral ischemia-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the adult mouse. *J Neurosurg* **101**: 799-805.

van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* **415**: 1030-4.

Volpe BT, Hirst W (1983). The characterization of an amnesic syndrome following hypoxic ischemic injury. *Arch Neurol* **40**: 436-40.

von Bohlen U, Halbach O (2007). Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res* **329**: 409-20.

Xu Y, Ku B, Cui L, Li X, Barish PA, Foster TC, Ogle WO (2007). Curcumin reverses impaired hippocampal neurogenesis and increases serotonin receptor 1A mRNA and brain-derived neurotrophic factor expression in chronically stressed rats. *Brain Res* **116**: 9-18.

Windle V, Corbett D (2005). Fluoxetine and recovery of motor function after focal ischemia in rats. *Brain Res*; **1044**: 25-32.

Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, Takasawa Ki, Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M (2001). Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke* **32**: 1890-6.

ZhanG J, Moats-Staats BM, Ye P, D'ercole AJ (2007). Expression of insulin-like growth factor system genes during the early postnatal neurogenesis in the mouse hippocampus. *J Neurosci Res* **85**: 1618-27.

Zhu DY, Liu SH, Sun HS, Lu YM (2003). Expression of inducible nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult rodent dentate gyrus.

*J Neurosci* **23**: 223-9.

Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG (1986). Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the Hippocampus. *J Neurosci* **6**: 2950-67.

## Legends for tables and figures

**Figure 1:** Schematic representation of experimental design.

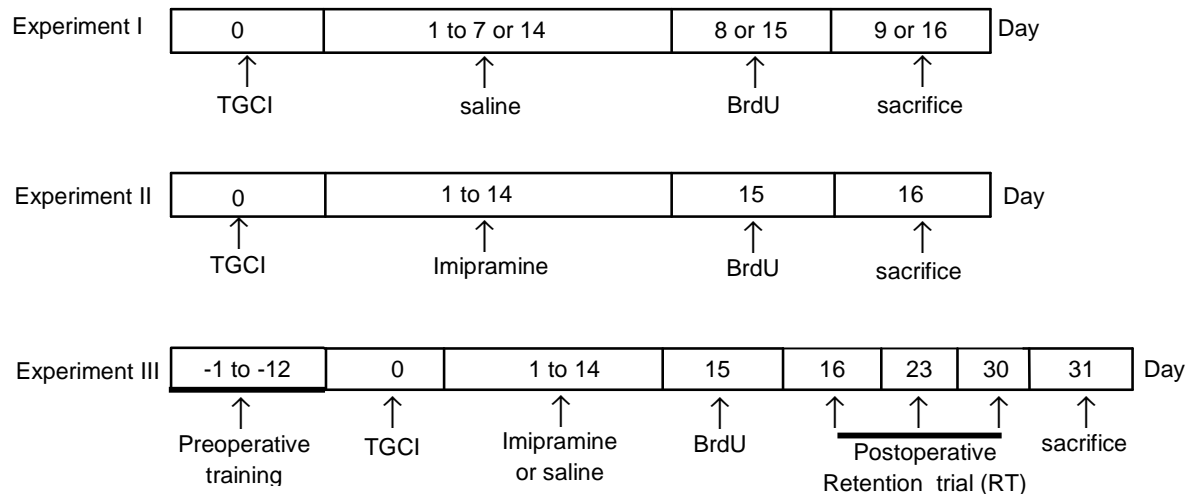
**Figure 2: Transitory global cerebral ischemia-induced cell proliferation in the DG of adult rats.** Rats were administered with BrdU (50 mg/Kg, *i.p.*, 4 x day) 7 or 14 days after transitory global cerebral ischemia (TGCI). Twenty four hours later the brains were processed for immunohistochemical detection of BrdU. (A) Density of BrdU-positive cells (number of BrdU-positive cells/area) in the subgranular zone (SGZ) and hilus of dentate gyrus (DG) of rats. Bars represent the means  $\pm$  SEM. \*\*  $P < 0.001$  different from all groups (ANOVA, Tukey's test). Representative photomicrographies from sham (B), 7 days after TGCI (C) and 14 days after TGCI (D). Note the majority of BrdU-positive cells (arrows) are mainly located in the SGZ and frequently appeared in clusters (circled area in C).

**Figure 3: Chronic imipramine treatment increases cell proliferation and neurogenesis in the DG after TGCI.** Imipramine (20 mg/Kg, *i.p.*) was administered for 14 days and BrdU was injected 24 h later for analysis of cell proliferation. Animals were sacrificed 24 h after BrdU administration. Immunohistochemistry for doublecortin (DCX) was performed for detection of immature neuroblasts. (A) Density of BrdU-positive cells in the DG of sham and ischemic rats. \* $P < 0.05$  and <sup>##</sup> $P < 0.001$  different from all groups and different from ischemic + saline group, respectively (ANOVA, Tukey's test). (F) Number of DCX-positive cells in the DG of sham and ischemic rats. \* $P < 0.05$  different from sham + saline and sham + imipramine groups. Representative photomicrographies of BrdU (B, C, D, and E) and DCX-positive cells (G, H, I and J) in the DG of sham + saline, sham + imipramine, ischemic + saline and ischemic + imipramine groups.

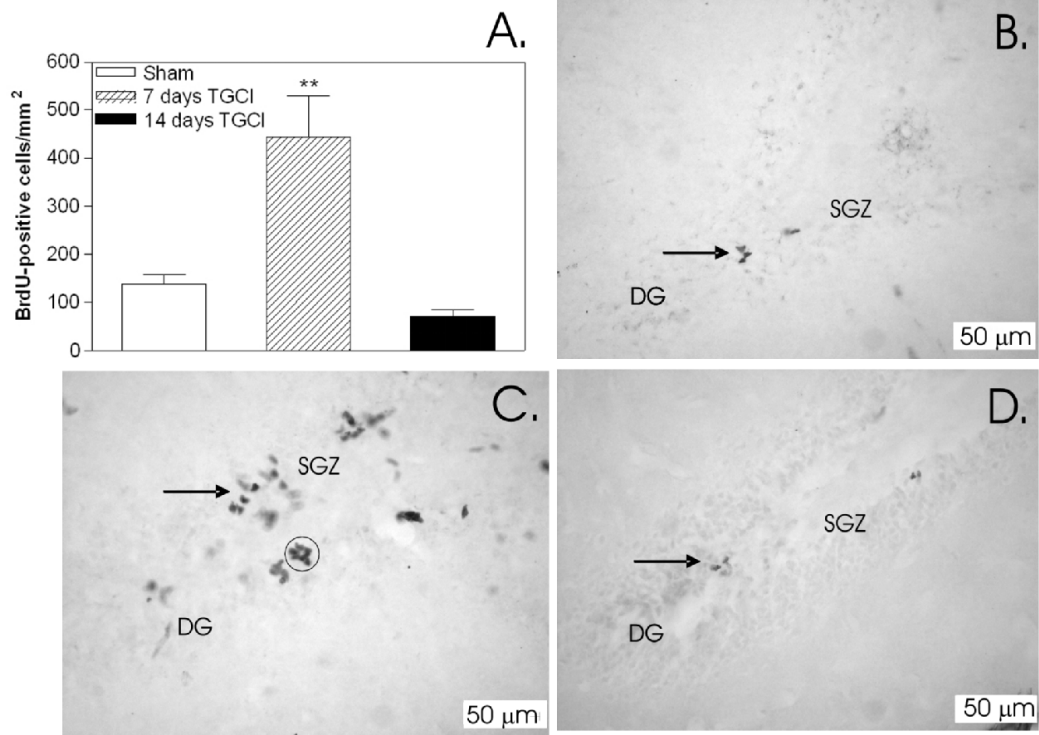
**Figure 4: Effect of chronic imipramine on retention performance in rats subjected to TGCI and tested in the 8 arms aversive radial maze (AvRM) task.** Rats were trained for 12 days before ischemia, and then subjected to sham or ischemia-operation. Retention trials (RT) were done on days 16, 23 and 30 post-ischemia (*upper panels*). Imipramine or saline administration started 24 h after ischemia and continued daily up



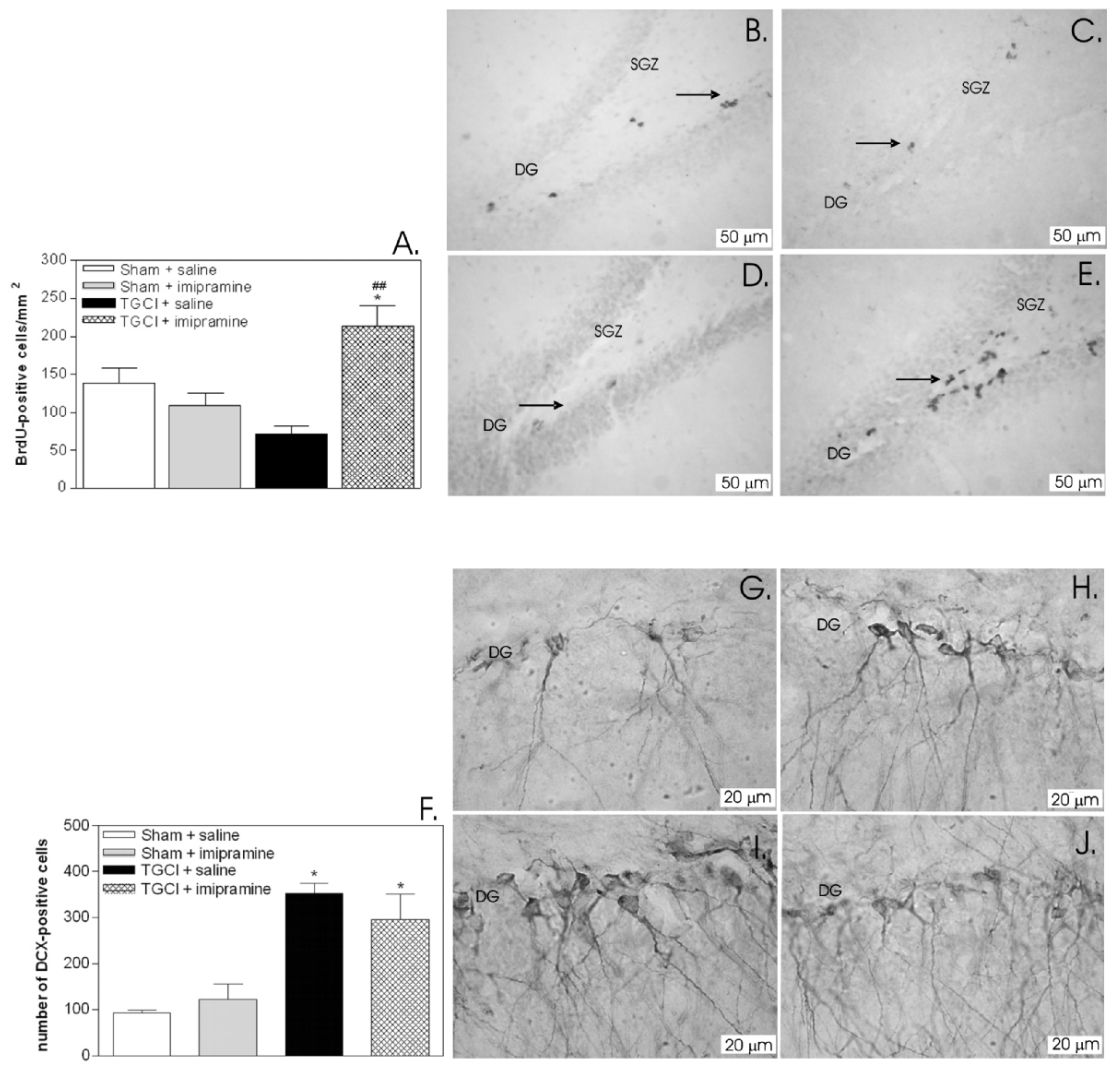
to day 15. Retention performance was measured in the absence of imipramine or saline. Pre-ischemic performance is given as the mean for the last three days of training (days 10-12). The 'total latency' and 'total number of errors' (mean  $\pm$  SEM), summed ( $\Sigma$ ) over RT1 to RT3 are represented in the *lower panels*. \* $P < 0.05$ , ischemia + imipramine group vs. sham + saline group;  $^{\$}P < 0.01$ , ischemia + saline post- vs. ischemia + saline pre-;  $^{+}P < 0.05$ , ischemia + imipramine post- vs. ischemia + imipramine pre-.



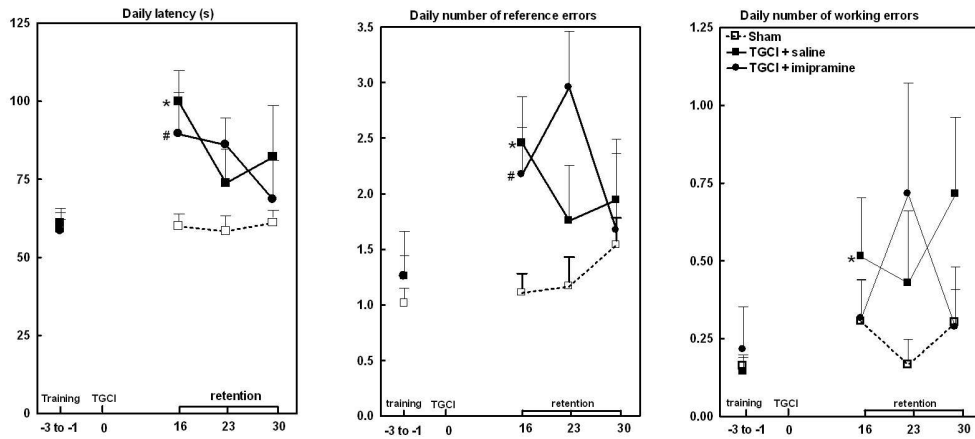
**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**



Pre- and post-ischemic testing days

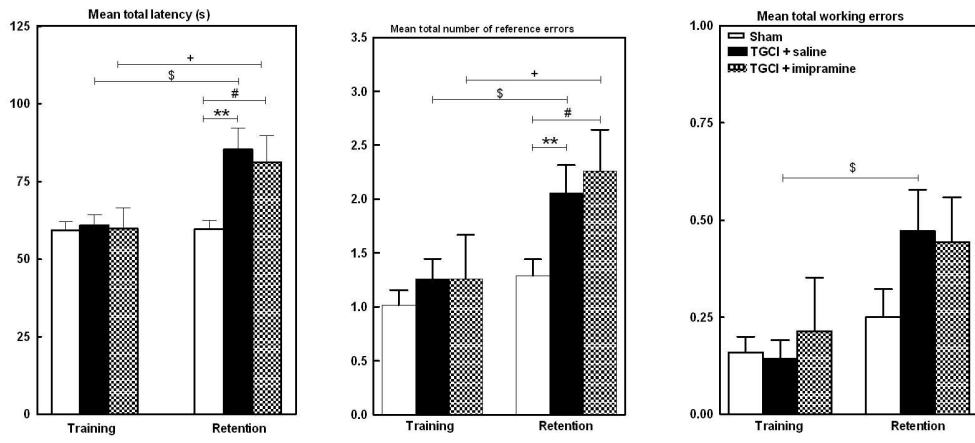


Figure 4